



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁵ C07K 15/14, A61K 37/02 C12N 15/19 // C12P 21/02 (C12P 21/02, C12R 1/91)	AI	(11) 国際公開番号 WO 90/10651
(21) 国際出願番号 PCT/JP90/00314 (22) 国際出願日 1990年3月9日(09. 03. 90)		(43) 国際公開日 1990年9月20日(20. 09. 1990)
(30) 優先権データ 特願平1/58631 1989年3月10日(10. 03. 89) JP 特願平2/6692 1990年1月16日(16. 01. 90) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒065 北海道札幌市東区南郷町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者: および (73) 発明者/出願人(米国についてのみ) 東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)(JP/JP) 〒350 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP) 清田伸二郎(MITSUDA, Shinjiro)(JP/JP) 〒349-01 埼玉県蓮田市桜台3-3-8 Saitama, (JP) 島 伸行(SHIMA, Nobuyuki)(JP/JP) 〒336 埼玉県浦和市鹿手袋801-1-306 Saitama, (JP) 坂垣康治(ITAGAKI, Yasuharu)(JP/JP) 〒320 栃木県宇都宮市滝の原2-5-18-302 Tochigi, (JP) 永尾雅哉(NAGAO, Masaya)(JP/JP) 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町大字石橋578-15-3-4 (74) 代理人 弁理士 藤野清也, 外(FUJINO, Seiya et al.) 〒102 東京都千代田区麹町5丁目4番 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AT(欧州特許), AU, BE(欧州特許), BR, CA, CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FI, FR(欧州特許), GB(欧州特許), HU, IT(欧州特許), JP, KR, LU(欧州特許), NL(欧州特許), NO, SE(欧州特許), SU, US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: GLYCOPROTEIN OF HUMAN ORIGIN, PHYSIOLOGICALLY ACTIVE FACTOR COMPRISING THE SAME, AND PHARMACEUTICAL PREPARATION CONTAINING THE SAME AS ACTIVE INGREDIENT		
(54) 発明の名称 ヒト由来の糖蛋白質及び該蛋白質からなる生理活性因子とそれを活性成分とする製剤		
(57) Abstract		
A glycoprotein is obtained from a supernatant of a culture medium of the fibroblasts of human origin. It has an antitumor activity and activities of inducing the differentiation of leukemia cells, enhancing cell-mediated immunity, accelerating the proliferation of endothelial cells of human blood vessel, and proliferating hepatic parenchymal cells.		

(57) 要約

ヒト由来の線維芽細胞の培養上清から、抗腫瘍活性、白血球細胞分化誘導活性、細胞性免疫増強活性、ヒト血管内皮細胞の増殖促進活性及び肝実質細胞の増殖活性を有する糖蛋白質が得られる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BJ ベナン	IT イタリア	RO ルーマニア
BR ブラジル	JP 日本	SD スーダン
CA カナダ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴ	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

明 細 書

ヒト由来の糖蛋白質及び該糖蛋白質からなる生理活性因子とそれを活性成分とする製剤

技 術 分 野

本発明は、ヒト由来の線維芽細胞の培養上清から得られた糖蛋白質及び該糖蛋白質からなる生理活性因子とそれを活性成分とする製剤に関する。

本発明の糖蛋白質は腫瘍細胞に対して障害作用を有し、且つ正常細胞に対して障害を示さない、新規な腫瘍細胞障害因子、白血病株分化誘導因子、細胞免疫能活性因子、血管内皮細胞増殖因子、肝実質細胞の増殖因子である。本物質は抗腫瘍剤、抗白血病剤、細胞免疫増強剤、創傷治療剤、肝再生促進剤等としてあるいは生化学的もしくは薬理作用の試薬として有用である。

背 景 技 術

ヒト由来の線維芽細胞が産生する生理活性物質、例えば腫瘍細胞障害因子としては β -インターフェロンが代表的な物質である。これは線維芽細胞を培養後、細胞をハーベストしポリ I - ポリ C やセンダイウィルスで刺激すると細胞外に分泌される糖蛋白質であり、抗ウィルス、抗腫瘍効果の他に、種々の生理活性を示すことが明らかになっている。特開昭58-146293号公報には、C B F と呼ばれる線維芽細胞由来の腫瘍細胞障害性糖蛋白質が開示されている。特開昭671-33120 号公報にはヒト組織由来の線維芽細胞培養液より抽出される分子量35,000~45,000腫瘍増殖阻害因子 (I N F) が開示され

ている。又、特開昭61-56131号公報には線維芽細胞より抽出される腫瘍壊死因子様物質が、特開昭61-1872号公報には、線維芽細胞由来壊死因子FNFが、特開昭62-103021号公報には、動物線維芽細胞から産生される分子量40,000~60,000、等電点 5.0 ± 0.5 の細胞障害作用を有する生理活性物質がそれぞれ開示されている。さらに、特開昭64-10998号公報には、ヒト由来の線維芽細胞の培養上清から得られる分子量36,000 $\pm 1,000$ 、等電点10.5以上の腫瘍細胞障害因子の全アミノ酸配列およびこれをコードするcDNA配列が開示されている。

発明の開示

本発明者らは、ヒト由来の線維芽細胞の培養上清に含まれる生理活性物質について検索を進めた結果、従来報告されている物質とは分子量、等電点等において異なる種々の生理活性を有する糖蛋白質を見出し本発明をなすに至った。

したがって、本発明は、ヒト由来の線維芽細胞の培養上清より得られる、新規な糖蛋白質及び該糖蛋白質からなる生理活性因子、さらにこの生理活性因子を活性成分とする製剤を提供することを課題とする。

本発明に係るヒト線維芽細胞由来の新規な糖蛋白質（以下、TCF-IIという）は下記に示す物理化学的特性により特定される糖蛋白質である。

- a. 分子量；SDS電気泳動法による分子量測定で、非還元では $78,000 \pm 2,000$ 又は $74,000 \pm 2,000$ の分子量であり、還元した場合、 $52,000 \pm 2,000$ の共通バンドAと、 $30,000 \pm 2,000$ のバンドB及び $26,000 \pm 2,000$ のバンドCの2本のバンド

を示す。

- b. 等電点 ; 7.4 ~ 8.6
- c. 熱安定性 60℃ 10 分間の加熱によっても安定
- d. pH 安定性 ; pH 6 ~ 9 の範囲で安定
- e. 糖鎖 ; コンカナバリン A (ConA) セファロースに吸着性を示す。
- f. 生理活性 ; KB 細胞、HeLa 細胞、L-929 細胞の増殖を抑制し、IMR-90 細胞の増殖を抑制しない
- g. 抗体との反応性 ; 抗 TNF 抗体、抗 リンホトキシン 抗体、抗 インターフェロン β 抗体によって障害活性が中和されない。

さらに、本発明の TCF- II は、下記の N 末端アミノ酸配列及びアミノ酸組成を有するものが好ましい。

- h. N 末端アミノ酸配列 ; 上記 B 及び C がバンド A のサブチェーンとなっており、又バンド A は N 末端アミノ酸がブロックされている。サブチェーン B 及び C は共に以下の N 末端アミノ酸配列をもつ ;

Val-Val-Asn-Gly-Ile-Pro-Thr-

または

Val-Val-Asn-Gly-Ile-Pro-Thr-X-Thr-Asn-Ile-Gly-X-Met-
Val-Ser-Leu-

ただし X は未同定を意味する。

- i. アミノ酸組成 ; 塩酸で加水分解すると次のアミノ酸組成を示す。

A.A	nmol	mol%
Asp	10.375	12.97
Glu	7.750	9.69
Ser	5.000	6.25
Gly	7.250	9.06
His	3.000	3.75
Arg	5.375	6.72
Thr	5.125	6.41
Ala	2.625	3.28
Pro	5.625	7.03
Tyr	3.875	4.84
Val	4.125	5.16
Met	1.875	2.34
Cys	ND	-
Ile	5.000	6.25
Leu	4.875	6.09
Phe	2.250	2.81
Trp	ND	-
Lys	5.875	7.34
合計	80.000	100(99.99)

なお、本発明TCF-Ⅱのアミノ酸配列は、下記に示す手順に従って、ヒト胎児肺由来線維芽細胞 (IMR-90) から、該TCF-ⅡをコードしたmRNAを精製した後、その遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し、その塩基配列から推定した。

(1) IMR-90細胞からのポリ(A)⁺RNAの抽出

5%のNew born calf serum (NBCS)を添加したDulbecco's modified eagle (DME)培地を用いて培養したIMR-90細胞 2×10⁸個から、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法 (Biochemistry 18 5294-5299 (1979))によりトータルRNAを調製した。IMR-90細胞に6Mグアニジンチオシアネート、5mM クエン酸ナトリウム、0.5%ザルコシル、0.1M β-メルカプトエタノール溶液28mlを添加し、ホモジナイズした。4 mlの5.7M塩化セシウム、0.1M EDTA 溶液をポリアロマー遠心管に入れ、その上にホモジナイズ溶液7 mlをのせ、ベックマン超遠心機40T1ローターで35,000rpm, 20℃、16時間超遠心分離を行った。遠心後、沈澱を95%エタノールで2回洗浄し、200 μlの10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5), 1mM EDTA溶液で65℃、5分間加熱することにより溶解し、トータルRNA 溶液とした。トータルRNA から、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマト法により、ポリ(A)⁺ RNA を精製した。オリゴ(dT)セルロースカラムを10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4), 1mM EDTA, 0.5M 塩化ナトリウム、0.05% SDS で平衡化し、トータルRNA を通し、吸着画分を10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4), 1mM EDTA, 0.05% SDSで溶出し、ポリ(A)⁺ RNA 溶液とした。

(2) cDNA の合成

(1)で得たpoly(A)⁺ RNA を鋳型として、cDNA合成キット (Pharmacia社)により二本鎖cDNAを作成し、EcoRI アダプターを付加した。作成方法は同社のプロトコールに従ったが、一本鎖cDNAの合成の際、トリ骨髄非球症ウイルス由来の逆転

写酵素(AMV RTase)を添加する改良を加えた(40 units/反応系、Life Science社)。

(3) cDNA library の作成

(2)で得た cDNA をファージベクター λ gt10 の EcoRI arm (Promega社) に組み込んだ。3.3 μ g の poly(A)⁺ RNA から合成した cDNA を 150 μ l の 66mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)、1 mM スペルミジン、10 mM 塩化マグネシウム、15 mM ジチオスレイトール、0.2 mg/ml ウシ血清アルブミン溶液 (カラム緩衝液) に溶解し、このうちの 5.2 μ l を 1 μ g の λ gt10 EcoRI arm と混合後、エタノールで沈澱させた。この沈澱を 9 μ l の カラム衝撃液に再溶解し、1 μ l の 10 mM アデノシン三リン酸、1 μ l の TM DNA リガーゼ (350 units/ μ l) を加え、16℃で一晩反応し、 λ gt10 と cDNA の組換えファージ DNA を作成した。

(4) cDNA ライブラリーのスクリーニング

(i) オリゴヌクレオチド プローブの作成

TCF- β 鎖の N 末端の 1 番目から 6 番目のアミノ酸配列に相当する 17mer の相補鎖オリゴヌクレオチド混合物 (384種 mix) を合成し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造)、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (Amersham 社) を用いて 5' 末端を標識してプローブとして用いた。このプローブは下記で示される。

プローブとして用いる相補鎖: 3' -CACCAGTTACCGTAGGG -5'
(384種 mix)

G	G	G	C	A
A	A		A	T
T	T		T	

(ii) 組換えファージのスクリーニング

(3)で作成した組換えファージ DNA溶液をGigapack Gold (Stratagene 社) を用いてin vitroで Packagingし、大腸菌 C600hfl に感染させ、約 50 万個のファージのプラークを得た。プラークをHybond-Nフィルター (Amersham社) に吸着させた後、フィルターをアルカリ変性、中和後、80 °C 2 時間bakingした。ハイブリダイゼーションは、Bellら(Nature 310 775-777, 1984) の方法に従い、(i) で作成したプローブで一次スクリーニングした。一次スクリーニングで陽性であったプラークのなかにTCF- II cDNA 断片を含むと思われるクローンが1つ得られた。

(5)アミノ酸に翻訳される全領域を含むTCF- II cDNA のクローニング

TCF- II の β 鎖N 末アミノ酸配列および α 鎖および β 鎖のリシルエンドペプチダーゼ処理により得られたそれぞれ一部内部アミノ酸配列(α)(1 文字表示)NYMGXLSQTRSGIおよび(β)TSXSVYGVWGYTGLINVDGLL(Xは未同定を示す)が、ヒト肝細胞増殖因子(hHGF)のアミノ酸配列とよく一致しているため、TCF- II はhHGFの遺伝子ファミリーの一種と考えられた。hHGFについては、宮沢ら(Biochemical and Biophysical Research Communication 163 967-973 (1989)), 中村(Nature 342 440-443(1989))によってそのcDNAの塩基配列が報告されているが、両者でアミノ酸配列が14箇所異なり、hHGF遺伝子ファミリーの存在が示唆されていた。そこで両者で一致している、ポリヌクレオチド鎖コード領域周辺の 5' - および 3' - 非翻訳領域のDNA の塩基配列を基にプライマーとなるオリゴヌ

クレオチドを合成し、Polymerase Chain Reaction(PCR)法により TCF-II cDNA の検索を行った。まず、DNA 合成機(Applied 社)により制限酵素 SalI の認識配列を有する Sal-77 プライマーと、制限酵素 SphI の認識配列を有する Sph2203 プライマーを合成した。これらプライマーを下記に示す。

Sal-77 プライマー: 5' - GGTCGACTAGGCACTGACTCCGAACAGGATTC-3'
SalI

Sph2203 プライマー: 5' - GGCATGCACAGTTGTATTGGTGGGTGCTTCAG-3'
SphI

PCR 法によるクローニングは以下の手順で行った。

(i) PCR

(2)で合成したcDNA(150 μ l のカラム緩衝液に溶解)	1 μ l
20 μ M Sal-77 プライマー	2.5 μ l
20 μ M Sph2203 プライマー	2.5 μ l
10xPCR反応液(500mM塩化カリウム、100mM トリス塩酸緩衝液に(pH8.3), 15mM塩化マグネシウム、0.1 % (w/v)ゼラチン)	10 μ l
1.25mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP混合液	16 μ l
Ampli Taq (5 units/ μ l 宝酒造)	0.5 μ l
蒸留水	67.5 μ l

上記の溶液を0.5 ml用の微量遠心チューブ中で混合後、ミネラルオイル(Sigma社) 約100 μ l で液面をおおった後、Quick Thermo System(日本ジェネティクス社)によりPCRを行った。反応条件は次に示した。94℃で7分前処理後、55℃3分(アニーリング反応)、72℃4分(ポリメラーゼ反

応)、94℃ 2分(変性)の三段階の反応を35回繰り返した後、後処理として55℃ 3分、72℃ 11分処理し、室温に戻した((注)それぞれの時間は温度が変化する時間も含む。)。反応液のうちの一部をアガロースゲル電気泳動にかけたところ約2.3キロベース(Kb)のDNA断片が得られ、これが目的のTCF-Ⅱ cDNAと考えられた。そこで反応液4本分から得た。DNAをエタノールで沈澱させた後、制限酵素SalIとSphIで消化し、アガロースゲル電気泳動にかけ、DE81ペーパー(Whatman社)で約2.3KbのDNA断片を回収した。

(ii) サブクローニング

(i) で得られた制限酵素SalIとSphIで消化された約2.3KbのcDNA断片を、プラスミドベクターpUC18(日本ジーン社)を制限酵素SalIとSphIで消化したベクター断片にライゲーションキット(宝酒造)を用いて挿入し、大腸菌DH5α(BRL社)の形質転換を行った(BRL社添付のプロトコールに従った)。結果として、20個以上のサブクローンを得ることが出来た。

(iii) 塩基配列決定

得られたサブクローンについてダイデオキシ法(Sequenase Ver. 2.0東洋紡)により塩基配列を決定した。Amp^r Taq(宝酒造)のヌクレオチド取り込みのミスを複数個のサブクロンの塩基配列を解析することにより補正した。上述のようにして得られたTCF-Ⅱ cDNAの塩基配列と、その配列から予想されるアミノ酸配列を第15図に示した。翻訳開始信号ATGから停止信号TAGまで2172塩基対(bp)あり、アミノ酸に翻訳すると723個のアミノ酸配列からなり、1番目のメチオニン

残基から29番目のアラニン残基までがシグナル配列と予想された。TCF-Ⅱは、 α 鎖、 β 鎖の二本のポリペプチド鎖がジスルフィド結合しているが、第15図に示すように最初は1本のポリペプチド鎖として合成されることがわかった。TCF-Ⅱの α 鎖のN末端はブロックされているために不明であるが、 β 鎖のN末端および α 鎖、 β 鎖の一部内部アミノ酸配列が前述のごとく決定しており、第15図中に示した。得られたTCF-Ⅱ cDNAの塩基配列は宮沢ら(Biochemical and Biophysical Research Communication 163 967-973(1989))の発見したhHGFと極めてよく一致するが宮沢らのhHGFのアミノ酸配列でいうと、162番目のフェニルアラニンから166番目のセリンまでの5残基(F-L-P-S-S)が、今回のTCF-Ⅱ cDNAでは欠失している点のみが異なり、TCF-Ⅱ cDNAは新しいHGF遺伝子ファミリーの遺伝子の1つであることがわかった。上記塩基配列から提案されるTCF-Ⅱのアミノ酸配列と宮沢からのhHGFのアミノ酸配列の比較は第16図に示すとおりである。

上記物理化学的性質により特定される新規な糖蛋白質TCF-Ⅱを得る方法を以下に説明する。

本発明に係る物質を生産するために使用する細胞としては、ヒト由来の線維芽細胞であればいずれでも使用可能である。好適な細胞としては、ヒト胎児肺由来株化細胞、ヒト胎児腎由来株化細胞、ヒト胎児包皮由来株化細胞等が挙げられる。本発明の実施においては、これら細胞のなかでIMR-90(ATCC CCL 186)、WI-38(ATCC CCL 75)などが特に適している。

これらの細胞は、通常の培養に用いられる血清培地もしくは

は無血清培地中で増殖させる。代表的な培地の例としてはダルベッコモディファイドイーグル培地 (DMEM) に子牛血清を5%添加した培地が挙げられる。この他に必要に応じ、アミノ酸、トランスフェリン、脂肪酸、インシュリンなどのホルモンを添加してもよい。

この培地中で細胞を培養するが、培養に当っては、Tフラスコ等を使用した静置培養、マイクロキャリアを使用した浮遊培養、ホローファイバーやセラミック担体を使用した連続培養の方法が採用し得る。培養条件は、CO₂ 5%空気雰囲気下で、20~37℃の温度、培地は2~3日ごとに交換することが好ましい。このようにして所望の細胞密度に到達した後は、7~10日ごとに培地を交換し、培養液を回収する。回収した培養液より目的物質である糖蛋白質を抽出精製する。

回収した培養液は分子量6,000以下をカットするUF膜処理により約10倍に濃縮し、その後、陽イオン交換体に吸着させた後、食塩濃度0.3M~0.6Mの緩衝液で溶出する。イオン交換体としてはCMセファデックス (ファルマシア社製) 等が例示できる。このようにして溶出される活性画分の中で腫瘍細胞増殖抑制活性を指標として最も強い腫瘍細胞増殖抑制活性を示す画分を集め、さらに糖アフィニティークロマトグラフィーを行う。糖アフィニティークロマトグラフィーとしてはConA-セファロースが特に適している。糖アフィニティークロマトカラムは0.5M NaClを含むpH 7.0の0.05M トリス塩酸緩衝液で平衡化した後、上記回収画分を負荷し、さら

にカラムを洗浄する。その後糖アフィニティーの結合糖鎖に応じた溶出液で溶出する。上述したConAセファロースを使用した場合は、メチルマンノピラノサイドを含む緩衝液で溶出される。溶出された活性画分は、水に対して透析を行い、凍結乾燥する。その後pH6.0～7.0の0.05M トリス塩酸緩衝液に溶解し、強陽イオン交換樹脂を充填剤としたHPLCによりさらに分離精製を行う。強陽イオン交換樹脂充填カラムとしてはMonoS(ファルマシア社製)が特に適する。MonoS カラムからの溶出は、0M→1.0Mの食塩のグラジエント溶出を行い、活性画分を集める。

本発明物質は、0.6M～0.9Mの塩強度部分に溶出される。このようにして得られた活性画分をさらにヘパリンセファロース(ファルマシア社製)を使用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。ヘパリンセファロースカラムからの溶出は0.3M→2.0Mの食塩グラジエントで行い、目的物質は1.0～1.5Mの塩強度部分に溶出される。次に、本発明のTCF-Ⅱの腫瘍細胞障害活性及び肝細胞増殖活性の測定について以下に記述する。

腫瘍細胞障害活性の測定

マウスL929(ATCC CCL1)を、本発明のTCF-Ⅱに最も感受性の高いクローンを選別した。このようにして腫瘍細胞障害因子高感受性クローンL929-18を得た。

L929-18を10%FCSを含むDMEMでコンフルエントになるまで培養し、その後トリプシン処理により細胞を剥離採取し、10%FCS および1 μ g/mLのアクチノマイシンDを含むDMEM

に 6×10^5 cells/ml の細胞密度になるように懸濁させる。

96穴マイクロプレート（ファルコン社製）の名ウエルに細胞懸濁液と同様に調製したDMEMを $50 \mu\text{l}$ に入れ、本発明物質TCF-Ⅱを含む試料も同様のDMEMで溶解又は希釈し、希釈列の第一穴に $50 \mu\text{l}$ を添加し、混合後、その $50 \mu\text{l}$ を第二穴に添加混合する。この操作を繰り返しながら希釈列を作成する。

試料の希釈列に各ウエル当り、細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$ 添加し、 CO_2 インキュベーター内で、 37°C 、2日間培養する。培養後、上清を静かに捨て、生理食塩水で2回洗浄後各ウエルに接着した生存細胞をメタノール：水＝1：4に調製した液に溶解した0.5%クリスタルバイオレット溶液を各ウエルに $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、染色固定する。蒸留水で各ウエルを洗浄し、染色プレートを風乾し、色素をセレンソン緩衝液（6.1 ml、0.1Mクエン酸二ナトリウム3.9 ml、0.1N塩酸、10 mlエタノールを混合）で溶出し、マイクロタイター分光光度計で570nmの吸光度を測定する。

50%の細胞死滅率を示す希釈倍率をTCF-Ⅱの単位数（u/ml）と規定する。

肝細胞増殖活性の測定

セグレンの方法（Method in cell biology, vol.13, p29, Academic Press, New York, 1976）に従い、ウィスター系雄ラットより肝実質細胞を単離した。この肝実質細胞を 8.8×10^4 個/0.5 ml/ウエルの濃度で24ウエルのプラスチックプレート（ファルコン）に播き、5%の CO_2 存在下、37

度で培養した。培地は、10%牛新生児血清（ハイクロン）、
10 μ M デキサメタゾン、100U /ml ペニシリン、100ug/ml ス
トレプトマイシンを含むウイリアムズE培地（フローラボラ
トリーズ）を使用した（以下、基礎培地と略す）。24時間
培養後、被験試料を含む基礎培地に交換し更に24時間培養
の後、 ^3H -チミジン（アマシャム）を4 $\mu\text{Ci/ml}$ (86Ci/m mo
l) を含む基礎培地に交換し2時間培養した後、DNA 合成を
測定した。尚、上記 ^3H -チミジンラベルに際し、各試験群を10
mMのヒドロキシウレア存在の有無で取り込ませ、そのカウ
ントの差を取り込み量とした。上記培養によるラベル後、細胞
を冷PBS、2%過塩素酸及び95%エタノールで、それぞれ
2回洗浄したのち風乾し、2mM EDTA, 20mM NaHCO_3 を含む
2%SDS の0.8mで可溶化し、液体シンチレーションカウン
ターにて測定した。

結果は第1表に示すとおりである。

第 1 表

被験試料	濃度 (ng/ml)	肝細胞増殖活性 (dpm/well, $\times 10^3$)
無添加	—	21.7 \pm 9.2
hEGF	20	239.3 \pm 7.2
TCF- II	1	93.7 \pm 29.7
	10	378.5 \pm 93.5
	100	467.4 \pm 77.3

(n = 4)

肝細胞増殖のポジティブコントロールとして hEGF(湧永製薬)を用いた。表より TCF- II の肝細胞増殖活性は、hEGF のそれより強いことが判る。

次に、本発明の TCF- II からなる生理活性因子を活性成分とする製剤について説明する。

本発明における上記生理活性因子は下記の薬剤活性を示す。

① 抗腫瘍活性

ヒト由来腫瘍細胞である KB、HeLa、MCF-7 及び BG-1 の増殖を抑制し、マウス由来 L-929 細胞及び腫瘍細胞である Sarcoma 180、Meth A Sarcoma、P388 に細胞障害活性を有するが、ヒト正常細胞である IMR-90 の増殖を抑制しない

② 白血病細胞分化誘導活性

ヒト白血病細胞 HL-60 を顆粒球に分化誘導する

③ 細胞性免疫増強活性

ヒト細胞障害 T 細胞の増強

④ ヒト血管内皮細胞の増殖促進活性

ヒト臍帯由来血管内皮細胞の増殖を促進する

⑤ 肝実質細胞の増殖活性

ラット肝臓由来肝実質細胞の増殖を促進する

これらの活性は 1-1000ng/ml の範囲の微量で発現する。

本物質は抗腫瘍剤、抗白血病剤、細胞免疫増強剤、創傷治療剤、肝再生化剤を含む肝疾患治療剤等として期待される。しかし、高分子糖タンパク質である本生理活性因子（以下TCF-Ⅱと称する）はバイアル等のガラス容器や注射筒等のようなポリプロピレン樹脂容器等への吸着が著しい上に不安定な物質である。

温度や湿度等によってその活性が著しく減少し容易に失活する。従って安定な形で製剤化されることが期待される。

即ち、本発明に係る製剤はタンパク質及び非イオン界面活性剤からなる群から選択される1つ又は2つ以上を吸着防止剤として、またタンパク質、糖類及びアミノ酸からなる群から選択される1つ又は2つ以上を安定化剤として含有すること、更に吸着防止剤として選択される1つ又は2つ以上と安定化剤として選択される1つまたは2つ以上との組合せを含有することを特徴とするTCF-Ⅱ製剤である。

本発明に係る製剤は、上述のような吸着防止剤および安定化剤がTCF-Ⅱと混在していればよく、その剤型は凍結乾燥、水溶液あるいは粉末のいずれでもよい。

本発明における活性成分であるTCF-Ⅱは、いかなる方法で製造、精製されたものでもよく、TCF-Ⅱ生産細胞の培養液から抽出し分離精製したもの、遺伝子工学的手法により大腸菌、酵母菌、チャイニーズハムスターの卵巣細胞等の哺乳動物細

胞を宿主として生産せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。

本発明において用いられるTCF-Ⅱの吸着防止剤のうちタンパク質類としてはアルブミン、ゼラチン等が、また非イオン界面活性剤としてはツイーン80、ツイーン20等が使用でき、また本発明に用いられるTCF-Ⅱの安定化剤のうちタンパク質類としてはアルブミン、ゼラチン等が、また糖類としてソルビトール、マンニトール、キシリトール等、アミノ酸としてはグリシン、アラニン等が使用できる。

これらの吸着防止剤のうちタンパク質類の添加量は0.1%以上、好ましくは0.1～20%で、非イオン界面活性剤類の添加量は0.001%以上、好ましくは0.001～1.0%である。また安定化剤のうちタンパク質類の添加量は0.1%以上、好ましくは0.1～20.0%で、糖類の添加量は5～40%、アミノ酸類の添加量は1%以上で配合することが好ましい。吸着防止剤のうち1つ又は2つ以上と安定化剤のうち1つ又は2つ以上と組み合わせて配合して使用する場合や安定化剤の2つ以上を配合して使用する場合においてもそれぞれの添加剤の添加量は上記範囲内であればよい。これらの吸着防止剤および安定化剤はそれぞれの相応する量を適当な濃度とpHの水溶液に調製して使用する。この溶液の浸透圧比は0.1～3.0、より好ましくは1.0である。TCF-ⅡのpH安定性域はpH6～9であるので製剤化時の水溶液のpHは6.0～9.0に調製することが好ましい。

次に実験例により、本発明の製剤の吸着防止性及び安定性

を更に詳しく説明する。

実験例 1. 吸着防止試験

ヒト胎児肺由来線維芽細胞であるIMR-90細胞(ATCC, CCL 186)を5%の子牛血清を含む培地で7日間培養し、その培養上清から抽出し、分離精製したTCF-Ⅱ 200 μ g を0.15 Mの食塩を含む0.01Mの磷酸緩衝液pH7(PBS)100 mlに溶解しこれを0.5 mlずつガラス試験管およびポリプロピレン樹脂製チューブに分注する。別に第1表a, b, cに示す添加物質のそれぞれの濃度の2倍濃度の溶液をPBSで調製する。上記の分注したTCF-Ⅱ溶液0.5 mlに添加物質のそれぞれの濃度の溶液を0.5 ml添加しよく混和する。TCF-Ⅱの最終濃度は1 μ g/ml、各添加物質の最終濃度は第1表a, b, cに記載した濃度に調整される。

なお、対照はTCF-Ⅱ溶液0.5 ml PBSを0.5 ml添加した。

各添加物質の各濃度について2本ずつ調製し、37℃で1時間保温後TCF-Ⅱ活性を測定し、結果はその平均値で求めた。

TCF-Ⅱの活性は以下のようにその腫瘍障害活性で測定した。

マウスL 929(ATCC, CCL1)をサブクローニングして得られたTCF-Ⅱに高感受性のクローンL929-18をターゲット細胞として用いた。

L929-18を10%FCSを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)でコンフルエントになるまで培養し、その後トリプシン処理により細胞を剥離採取し、10%FCS および 1 μ g/mlのアクチノマイシンDを含むDMEMに 6×10^5 cells/mlの細胞密度になるように懸濁させる。

細胞懸濁液調製に用いたDMEMを用いて試料サンプルを希釈し、20倍以上の一連の希釈列を作製する。20倍以上の一連の希釈列の各試料をそれぞれ50 μ l ずつ96穴マイクロプレート（ファルコン社製）の各ウェルに添加する。

試料の希釈列に各ウェル当たり、細胞懸濁液を50 μ l 添加し、CO₂ インキュベーター内で、37℃、2日間培養する。培養後上清を静かに捨て、PBS で2回穏やかに洗浄後各ウェルに接着した生存細胞をメタノール：水 = 1 : 4 の混合液に溶解して0.5 %クリスタルバイオレット溶液を各ウェルに50 μ l ずつ添加し、染色固定する。蒸留水で各ウェルを洗浄し、風乾後、色素をセレンソン緩衝液(6.1ml, 0.1Mクエン酸二ナトリウム、3.9 ml, 0.1N塩酸、10 mlエタノールを混合)で溶出し、マイクロタイター分光光度計で570nm の吸光度を測定する。

50 %の細胞死滅率を示す希釈倍率をTCF-Ⅱの単位数 (u/ml) と規定し、試料調製直後の活性 (u/ml) を100 %として試験処理後の残存活性を相対活性 (%) として求めた。

結果は、第2表a, b, c に示したように、TCF-Ⅱはガラスやポリプロピレン樹脂表面に容易に吸着されるが、本発明で用いる吸着防止剤が製剤の吸着防止効果を有していることが判る。

20

第 2 表

(1) ガラス試験管

a. 高分子賦活剤の効果

添 加 物

濃 度 (%)	ヒト血清 アルブミ ン (HSA)	低分子量* ゼラチン	ゼラチン	ポリエチレン グリコール 4000	デキスト ラン 40
-----残存相対活性 (%)-----					
0	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
0.01	16.7	8.3	25.0	8.3	-
0.05	25.0	8.3	37.5	8.3	8.3
0.10	50.0	16.7	50.0	16.7	-
0.25	100.0	16.7	100.0	16.7	8.3
0.50	100.0	33.3	100.0	16.7	8.3
1.00	100.0	50.0	100.0	16.7	12.5
2.00	100.0	100.0	100.0	33.3	12.5
10.00	100.0	100.0	100.0	-	75.0
20.00	100.0	100.0	100.0	-	-

* : 平均分子量6,000(ニッピ株)

b. 非イオン界面活性剤の効果

添 加 物

濃 度	ツイーン80	ツイーン20
-----	--------	--------

(%)

-----残存相対活性 (%)-----

0	8.3	8.3
0.0001	16.7	16.7
0.0005	25.0	25.0
0.001	50.0	50.0
0.005	100.0	100.0
0.01	100.0	100.0
0.05	100.0	100.0
0.10	100.0	100.0
1.00	100.0	100.0

(2) ポリプロピレン樹脂チューブ

c. ヒト血清アルブミンおよびツイーン80の効果

添加物		添加物	
濃 度	ヒト血清	濃 度	ツイーン
(%)	アルブミン (HSA)	(%)	80
残存相対活性 (%)		残存相対活性 (%)	
0	25.0	0	25.0
0.01	50.0	0.0001	33.3
0.10	75.0	0.0005	50.0
0.25	100.0	0.001	75.0
0.50	100.0	0.005	100.0
1.00	100.0	0.01	100.0
2.00	100.0	0.05	100.0
10.00	100.0	0.1	100.0
20.00	100.0	1.0	100.0

実験例 2. 安定性試験

TCF-Ⅱのガラス壁への吸着を完全に防げる条件下で各種添加物質のTCF-Ⅱの安定性に及ぼす効果を試験した。即ちIMR-90由来のTCF-Ⅱ 120 μ g を0.02%のツイーン80を含むPBS 30 mlに溶解し、0.22 μ のフィルターで濾過滅菌後、滅菌ガラス試験管に0.5 mlずつ分注した。

第2表a, b, c に示す各種添加物質について2倍濃度の溶液をPBSで溶解調製したのち、0.22 μ のフィルターで濾過滅菌し、それぞれについて0.5 mlずつTCF-Ⅱ溶液0.5 mlに添加しよく混

和して後、雑菌汚染を防ぐためガラス試験管を密封した。対照としてTCF-Ⅱ溶液0.5 mlにツイン80を含まないPBS0.5 mlを加えたものを使用した。TCF-Ⅱの最終濃度は $2 \mu\text{g/ml}$ に、ツイン80の最終濃度は0.01%に、各添加剤の最終濃度は第3表a, b, c に示す濃度になる。

各試験区につき2本調製し、40℃、1週間保存後TCF-Ⅱ活性を測定し、保存前のTCF-Ⅱ活性 (u/ml) を100%として保存後の活性を相対活性 (%) で示した。

結果は平均値で求めた。結果は第2表に示す。

第3表a, b, c の結果から、本発明で用いる安定化剤が水溶液状態において製剤の活性成分であるTCF-Ⅱ活性を安定に保つ効果を有していることが判る。

第 3 表

a. 高分子賦型剤のTCF-Ⅱの安定性に及ぼす効果

		保存期間 (日) 40 °C		
		0	3	7
添加濃度 (% W/V)		-----残存相対活性 (%)-----		
ヒト血清 アルブミン	0.0	100.0	25.0	16.7
	0.1	100.0	50.0	33.3
	0.25	100.0	100.0	100.0
	0.5	100.0	100.0	100.0
ゼラチン	0.0	100.0	25.0	16.7
	0.1	100.0	25.0	25.0
	0.25	100.0	100.0	100.0
	0.5	100.0	100.0	100.0
低分子ゼラチン (平均分子量6,000)	0.0	100.0	25.0	16.7
	0.5	100.0	25.0	16.7
	2.5	100.0	33.3	25.0
ポリエチレングリコール4000	0.0	100.0	25.0	16.7
	0.5	100.0	16.7	12.5
	2.5	100.0	16.7	12.5

注: 全ての試験区にツイーン80が最終濃度として0.01%
含まれている。

b. 糖類の添加効果

		保存期間 (日) 40 °C		
糖 類	添加濃度	0	3	7
	(% W/V)	-----残存相対活性 (%) -----		
デキストラン40	0	100.0	25.0	16.7
	2	100.0	25.0	8.3
	10	100.0	12.5	4.2
ソルビトール	0	100.0	25.0	16.7
	2	100.0	33.3	25.0
	10	100.0	66.7	66.7
	20	100.0	100.0	100.0
	40	100.0	100.0	100.0
マンニトール	0	100.0	25.0	16.7
	2	100.0	33.3	16.7
	10	100.0	66.7	50.0
	20	100.0	100.0	95.0
	40	100.0	100.0	100.0
グルコース	2	100.0	16.7	8.3
	10	100.0	12.5	4.2
	0	100.0	25.0	16.7

2 6

フラクトース	2	100.0	12.5	6.3
	10	100.0	< 2.0	< 2.0
マンノース	0	100.0	25.0	16.7
	2	100.0	16.7	4.2
	10	100.0	< 2.0	< 2.0
キシリトール	0	100.0	25.0	16.7
	2	100.0	33.3	16.7
	10	100.0	100.0	66.7
	20	100.0	100.0	96.5

c. アミノ酸の添加効果

		保存期間 (日) 40 °C		
添加濃度		0	3	7
アミノ酸	(%)	-----残存相対活性 (%)-----		
アルギニン	0	100.0	25.0	16.7
	1	100.0	25.0	16.7
	5	100.0	50.0	33.3
グリジン	0	100.0	25.0	16.7
	1	100.0	33.3	25.0
	5	100.0	100.0	66.7
	10	100.0	100.0	100.0
リジン	0	100.0	25.0	16.7
	1	100.0	25.0	16.7
	5	100.0	66.7	16.7
アラニン	0	100.0	25.0	16.7
	1	100.0	25.0	16.7
	5	100.0	100.0	50.0
	10	100.0	100.0	90.0

注：全ての試験区にツイーン80が最終濃度として0.01%含まれている。

次に、本発明の製剤活性を試験した結果を示す。

ヒト新規サイトカインTCF-ⅡのSarcoma 180 に対する
in vivo抗腫瘍試験

材料および試験方法：

①実験動物

ICR マウスはチャールス・リバー・ジャパンより購入し、雌の7週齢を用いた。

②腫瘍細胞

Sarcoma 180 は、国立癌センターより分与を受け、当研究所にて週1回マウスで継代維持したものを用いた。

③試験試料

TCF-Ⅱは0.01%ツイーン、0.25%ヒト血清アルブミンおよび0.8%の食塩を含む0.01M リン酸緩衝液、pH7.0 に溶解し、製剤化した。

0.2 μ g TCF-Ⅱ/0.2mlおよび1.0 μ g TCF-Ⅱ/0.2mlの2種類のTCF-Ⅱ試料を作製した。パイロジェンの影響を調べるため、1.0 μ g TCF-Ⅱ中に含まれるパイロジェン相当量の標準パイロジェン（ディフコ社製）試料(940 pg/0.2 ml)を同様に調製した。

④予備毒性試験

予備毒性試験は1群2匹で実施した。

ICR マウス尾静脈内に1回TCF-Ⅱを10 μ g および20 μ g/マウス投与し、動物の死亡を指標に毒性の判定を行った。

⑤抗腫瘍試験

抗腫瘍試験は1群7匹で行った。

Sarcoma 180(10^6 /mouse)をICR マウス皮下に移植し、生着

の確認された時点で群分けを行い1日1回、連日7日間尾静脈内に試料を投与した。増殖抑制効果は対照群に対する投与群の平均腫瘍重量(MTW)より抑制率($\frac{C-T}{C} \times 100\%$)を求めて判定した。

試験結果：

① 予備毒性試験

10 μ g および20 μ g/mouse 投与とも毒性は認められなかった。

② 抗腫瘍試験

投与開始3週間後の試験結果を第4表に示す。

第 4 表

試料	投与量	MTW(mg)	$\frac{C-T}{C} \times 100(\%)$
対 照	0.0	3024.71	-
パイロジェン	940pg/mouse	3036.00	-0.37
TCF-Ⅱ	0.2 μ g/mouse	1787.71	49.92
TCF-Ⅱ	1.0 μ g/mouse	1984.21	34.40

上記試験においてTCF-Ⅱの最適投与量が未知であったので投与量に設定に多少問題があったが、この結果を見た場合、投与量の少ないほうがより効果的であるように思われる。

さらに、腫瘍内投与によるTCF-Ⅱの抗腫瘍効果を下記方法により調べた。

試験方法：

ICR マウス皮下に 1×10^6 個/mouseのSarcoma 180 細胞を移植し、1週間後固型腫瘍が生着したマウスを選別した。マウス1匹当たり、1日1回、7日間連続でTCF-Ⅱを0.2 μ g ずつ

つ投与した。投与終了後2週間観察したところ、腫瘍部は黒変壊死を起していて著しい抗腫瘍効果を示した。また、腫瘍の消失したマウスも観察された。

図面の簡単な説明

第1図は、子牛血清を5%含有するIMR-90培養液のCM-セファデックスC-50クロマトグラフィーから得られる蛋白、プラスミノーゲンアクチベーター及びTCF-IIの溶出プロフィールを示す。(1)は、0.3M NaCl 含有 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) による溶出画分を、(2)は0.6M NaCl 含有0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) による溶出画分をそれぞれ示す。
—○—は吸光度を、—●—はプラスミノーゲンアクチベーター活性を、また—①—は腫瘍細胞障害活性をそれぞれ示す。

第2図は、IMR-90培養液のCM-セファデックスC-50クロマトグラフィーから得られた0.6M NaCl 含有0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) 溶出画分のConAアフィニティクロマトグラフィーの結果を示す。

(1)は、0.5M NaCl 含有0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) による洗浄画分を、(2)は0.5M NaCl 及び0.3M α -メチルーD-マンノピラノサイド含有0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) による溶出画分を示す。

—●—は吸光度を、—①—は腫瘍細胞障害活性をそれぞれ示す。

第3図は、ConAセファロースアフィニティクロマトグラフィーから得られたTCF-II画分のMonoS-HPLC による溶出パターンを示す。

—○—は腫瘍細胞障害活性を示す。

第4図はMonoS-HPLC から得られたTCF-Ⅱ画分のヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。

(1)は洗浄を、(2)は食塩濃度勾配(0.3M → 2.0M) による溶出を示す。

—●—は吸光度を、また—○—は腫瘍細胞障害活性を示す。

第5図はTCF-Ⅱ(未還元および還元)のSDS電気泳動を示す。

第6図は、TCF-Ⅱの熱安定性を示す。

第7図は TCF-ⅡのpH安定性を示す。

第8図は、インビトロでのヒト腫瘍細胞の障害活性に及ぼすTCF-Ⅱの効果を示す。

第9図は、TCF-ⅡのSarcoma180に対する細胞障害活性を、

第10図は、TCF-ⅡのMeth A及びP388に対する細胞障害活性をそれぞれ示す。—●—はMeth A、—○—はP388のそれである。

第11図は、TCF-Ⅱのヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制率を示す。—●—は卵巣癌細胞株BG-1、—○—は乳癌細胞株MCF-7のそれである。

第12図は、リンパ球混合培養5日目におけるリンパ球中に取り込まれた³Hチミジンの放射能濃度を、また第13図は培養8日目のそれを示す。又各サンプルは6検体ずつ測定し、平均値±SDとして示している。

第14図は、TCF-Ⅱの血管内皮細胞HUVEC に対する増殖活

性を示す。

第15図(1)および(2)はTCF-Ⅱ cDNA の塩基配列及びこの配列から推定されるTCF-Ⅱ のアミノ酸配列を示す。

第16図は上記塩基配列から推定されるTCF-Ⅱ のアミノ酸配列と宮沢らのhHGFのアミノ酸配列との比較を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

糖蛋白質TCF-Ⅱ の調製

(1) ヒト線維芽細胞株IMR-90の培養

ヒト線維芽細胞IMR-90(ATCC CCL 186)細胞を5%子牛血清(CS)を含むDMEM100 mlを入れた1ℓ容量のローラーボルトに 3×10^6 個の細胞を移植し0.5～2回転/分の回転速度で回転させながら7日間培養を続けた。総細胞数が 1×10^7 個になったところで、トリプシンにより細胞を剥離し、細胞をボルト底面に集め、5～9メッシュのセラミック100g(京芝セラミック社製)を滅菌して投入し、24時間静置して培養した。その後、上記CSを5%含むDMEM培地を500 ml加え、培養を継続した。7～10日ごとに培地を全量回収し、新鮮培地を補給した。このようにして2ヶ月間の生産を継続し、ローラーボルト1本当たり4ℓの培養液を回収した。

このようにして得た培養液当りの比活性は32 u/mlであった。

(2) 糖蛋白質TCF-Ⅱ の精製

前記(1)で得た培養液75 ℓをアミコン製メンブレンフィル

ター(MW6,000カット) 処理によりUF濃縮し、液量を1/10にした。次いでCMセファデックスC-50(ファルマシア社製)をpH 7.0の0.05M トリス-塩酸緩衝液で平衡化させた後、上記UF濃縮液10 l当りにつき湿重量1.5 kgの樹脂を加え、pH6.5~7.0 下でゆるやかに攪拌しながら4℃で24時間吸着させた。吸着後、樹脂をワットマンNo.2で濾過し、回収した樹脂は、pH7の0.05M トリス-塩酸緩衝液で洗浄した。約1500gの洗浄後の樹脂を径7 cm×40 cmのカラムに充填し、0.01% トウエン20および0.3M食塩含有0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.0で溶出した。280nmの吸収をモニターし、蛋白がほぼ溶出し終えたところでさらに塩強度を0.6M食塩として溶出を行った。各フラクションは、腫瘍細胞障害活性を測定すると共に、IMR-90が生産する組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA) 活性を測定した。このようにして得た溶出パターンを第1図に示した。0.6Mの食塩強度で溶出される画分が強い腫瘍細胞障害活性を示した。この画分をTCF-II画分とした。

次いで、ConA-セファロースCL-6B(ファルマシア社製)を0.5M食塩含有のpH7.0、0.05M トリス-塩酸緩衝液で平衡化し、径2.5 cm×8 cmのカラムに充填した。このカラムを同じ緩衝液でさらに良く洗浄し、CM-セファデックスカラムで溶出されたTCF-II画分(pH7.0)を負荷した。その後再度カラム容量の10倍量の0.5Mの食塩含有pH7.0、0.05M トリス-塩酸緩衝液でカラムを洗浄した後、0.5M食塩及び0.3M α -メチル-D-マンノピラノサイド含有pH7.0、0.05M トリス-塩酸緩衝液で1時間当り70 mlの流速で溶出した。各溶出画分は

腫瘍細胞障害活性を測定するとともに280nmの蛋白吸収をモニターした。第2図に示す溶出パターンを示した。

最初に溶出される画分を回収し、蒸留水に対し4℃で48時間透析を行い、その後凍結乾燥を行い、白色の粉末を得た。この粉末を最少量の0.01%トウエン20を含むpH7.0、0.05M トリス-塩酸緩衝液で溶解し、0.01%トウエン20含有pH7.0の0.01M リン酸緩衝液で平衡化したHPLC用MonoSカラム（ファルマシア社製）に負荷した。負荷後0.01%トウエン20含有pH7.0、0.01M リン酸緩衝液で20分間、0.5 ml/分の流速で洗浄した後、60分間0.5 ml/分の流速で、最終塩濃度が食塩1Mになるような濃度勾配で溶出を行った。溶出のパターンは第3図に示す。活性画分は0.76M 食塩を頂点として溶出された。活性画分を回収し、再度MonoSカラムに負荷し、同じ緩衝液で、食塩濃度、1.0Mまでの濃度勾配で再度溶出を行った。

活性画分を回収し、次いで、径1.0 cm×7 cmのカラムに5 ml充填したヘパリンセファロース（ファルマシア社製）を0.3M 食塩を含有したpH7.5、10 mMトリス-塩酸緩衝液で平衡化し、このカラムに活性画分を食塩濃度が0.3Mになるように0.01M トリス-塩酸緩衝液（pH7.0）で希釈し、上記ヘパリンセファロースカラムに負荷した。その後充填ゲル量の10倍量のpH7.5、0.3M食塩含有0.01M トリス-塩酸緩衝液で洗浄した。さらに同じpHの緩衝液で、0.3Mから2.0Mまでの食塩濃度勾配により1時間当り20 mlの流速で溶出した。溶出パターンを第4図に示す。

このようにして糖蛋白質を得た。第5表に示す通り、751の培養液を出発材料として0.12mgの活性な蛋白質を得ることができた。同時に、この糖蛋白質は、腫瘍細胞障害因子であり、比活性は5,248,000 u / mgであった。

(以下余白)

第 5 表

IHR-90の培養液 (5%CS含有) から得られた腫瘍細胞腫瘍因子の精製

精製工程	TCF-II: CHセファデックス C-50 クロマトグラフィーから0.6M NaCl で溶出される画分					精製倍率 Fold	回収率 (%)
	容 (ml)	蛋 白 (mg/ml)	全蛋白 (mg)	腫瘍細胞障害活性 (u/ml)	全活性 ($\times 10^{-4}u$)	比活性 (u/mg)	
培養液	75000	3.30	247500.0	32.0	24.0	9.7	100.0
UF濃縮物	10000	23.40	234000.0	192.0	192.0	8.2	80.0
CHセファデックスクロマト (0.6 M NaCl 溶出画分)	894	0.23	205.6	2048.0	183.1	8904.3	76.3
ConA-セファロースクロマト	244	0.26	63.4	5120.0	124.9	19692.3	52.0
MonoS-IIPLC	13	0.16	2.1	80000.0	104.0	50000.0	43.3
ヘパリン-セファロースクロマト	6	0.02	0.12	104960.0	56.0	5248000.0	23.3

上述のようにして得られたTCF-Ⅱの物理化学的性質を測定した結果を以下に例示する。

① SDS 電気泳動法による分子量測定

0.1 % SDS を含むポリアクリルアミドゲルを用い電気泳動による分子量測定を行った。糖蛋白質は78,000及び74,000の近接したバンドを示した。また2-メルカプトエタノールにより還元処理を行い、同様に電気泳動を行ったところ分子量52,000及び28,000、32,000の3本のバンドが得られた(第5図参照)。このことからTCF-Ⅱは、分子量52,000の共通サブユニットに、分子量32,000のサブユニットあるいは分子量28,000のサブユニットが結合した複合体であることが予測される。

② 等電点

LKB 製等電点電気泳動装置を用いPhast Gel IEF3-9による等電点を測定したところ、7.4 ~ 8.55の等電点を示した。

③ 熱安定性

pH7.5 に調製した0.01%ツイン20を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液に51,200u/mlの活性に溶解したTCF-Ⅱを加え、512u/mlの溶液を調製した。この活性を有する液を25、35、50、60、70、80、90、95℃の各温度で10分間処理し、25℃の活性に対する相対活性を測定した。第6図に示す通り、60℃までは熱安定であった。

④ pH 安定性

第6表に示す組成の各緩衝液(いずれも0.01%ツイン20を含有)を精製し、各pHの緩衝液に、pH8調製時に51,200u/ml

に相当するTCF-Ⅱを溶解し、37℃で1時間放置後の活性を測定し、pH8、室温で1時間放置した場合と比較した相対活性を測定した。第7図に示す通り、pH6～9の範囲で安定であった。

第 6 表 調製緩衝液

pH 1 ~ 3	1/10M グリシン-塩酸
pH 4 ~ 6	1/10M 酢酸緩衝液
pH 7 ~ 8	1/10M トリス-塩酸
pH 9 ~ 12	1/10M グリシン-水酸化ナトリウム

⑤ N末端アミノ酸配列

50 μ g のTCF-Ⅱを還元し、エレクトロブロット法により、分子量52,000のA、32,000のB、28,000のCと3蛋白質に分離し、各蛋白質についてアブライド社製477A型プロテイナーケンサによりN末端アミノ酸配列を分析した。AはN末端がブロックされているため、N末端アミノ酸配列の分析が測定できなかったが、B、Cは共に下記に示す共通のN末端アミノ酸配列を示した。

Val-Val-Asn-Gly-Ile -Pro-Thr- X - Thr-Asn-Ile -Gly
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 X -Met-Val-Ser-Leu
 13 14 15 16 17

Xは未同定を示す。

このBおよびCのN末端アミノ酸配列が全く同一であることからTCF-Ⅱは分子量52,000のAと分子量32,000のBあるいは分子量28,000のCがSS結合により結合した2本鎖構造を有

していると考えられる。

⑥ アミノ酸組成

バイオラッド社製プロテインアッセイキットにより測定した蛋白量 $10 \mu\text{g}$ に相当する量を塩酸加水分解により分解し、日立製 L-8500 型アミノ酸分析計によりアミノ酸組成を測定した。

40

次に示すアミノ酸組成を得た。

アミノ酸組成：

A.A	nmol	mol%
Asp	10.375	12.97
Glu	7.750	9.69
Ser	5.000	6.25
Gly	7.250	9.06
His	3.000	3.75
Arg	5.375	6.72
Thr	5.125	6.41
Ala	2.625	3.28
Pro	5.625	7.03
Tyr	3.875	4.84
Val	4.125	5.16
Met	1.875	2.34
Cys	ND	-
Ile	5.000	6.25
Leu	4.875	6.09
Phe	2.250	2.81
Trp	ND	-
Lys	5.875	7.34
合計	80.000	100(99.99)

実施例 2

本例は、実施例 1 で得た糖蛋白質 TCF-Ⅱ の腫瘍細胞障害活性を示す。

①腫瘍細胞増殖抑制

腫瘍細胞株である HeLa、KB、ヒト 2 倍体細胞である IMR-90 をそれぞれ 10% FCS 含有 DMEM に $10^5/ml$ の細胞密度に調製した細胞懸濁液を作製した。マイクロウエルプレート（ファルコン社製）に $50 \mu l$ ずつ各細胞を播種した。各ウエルに、 $5, 120 u/ml$ の TCF-Ⅱ を上述の培地より 10, 20, 40, 80, 160 倍に希釈したものを $50 \mu l$ ずつ加え、混合後 CO_2 インキュベーター中で $37^\circ C$ 3 日間培養した。各ウエルに生存した細胞をメタノール：水 = 1 : 4 に調製した液に溶解した 0.5% クリスタルバイオレット溶液を各ウエルに $50 \mu l$ ずつ添加し染色固定した。蒸留水で各ウエルを洗浄後プレートを風乾し、色素をセレンソン緩衝液で溶出し、マイクロタイター分光光度計で 570nm の吸光度を計測した。

各細胞について TCF-Ⅱ 無添加群を対照として細胞増殖抑制率 (%) を計算し、TCF-Ⅱ 濃度との関係を求めた。第 8 図に示す通り、正常細胞である IMR-90 には増殖抑制を示さないが、KB、HeLa 細胞には強い抑制を示した。

②既存物質に対する抗体との反応

TCF-Ⅱ を 10% FCS 含有 DMEM に $320 u/ml$ の濃度になるように溶解調製した。一方、抗 LT 抗体を同じ培養液中に $LT 1000 u/ml$ を中和するタイター価になるように加え、 $37^\circ C$ で 1 時間放置し反応させた。同様に抗 TNF 抗体を $1 \times 10^6 u/ml$ 、

抗INF β 抗体を1000u/mlとなるように加え反応させた。尚、各抗体はいずれも市販のものを用いた。

反応後、各抗体による中和効果を、TCF- II 活性を測定することによって確認したが、いずれも活性の中和効果は認められなかった。

実施例 3

本例は実施例 1 で得た糖蛋白質TCF- II のマウス由来各種腫瘍細胞に対する細胞障害活性を示す。

マウス由来腫瘍細胞株として、Sarcoma180、MethA sarcoma およびP-388 の3株を用いた。

Sarcoma180細胞は10%牛胎児血清を含むDMEMにまたMethA およびP388は細胞10%牛胎児血清を含むRPMI 1640 培地に、それぞれ 2×10^4 細胞/mlとなるように懸濁し、それぞれの細胞懸濁液を調製した。

96 ウェル平底マイクロウェルプレート（ファルコン社製）の各細胞懸濁液を50 μ l ずつ播種した。

TCF- II はSarcoma180用には10%牛胎児血清を含むDMEMに、またMethA およびP-388 用には10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地に溶解、希釈して、TCF- II 溶液を調製した。それぞれの細胞懸濁液を播種した各ウェルにTCF- II 溶液を50 μ l ずつ添加し、TCF- II の最終濃度が0、2、4、8、16、31、62、125、250、500、1000 ng/mlになるように調製した。混合後、CO₂ インキュベーター中、37℃、3日間培養した。各ウェル中の細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞のみを血球計算板を用いて計数し、2回の実験値の平均値を求

めた。各細胞についてTCF-Ⅱ無添加群を対照として、細胞障害活性(%)を以下の計算式により計算し、TCF-Ⅱ濃度との関係を求めた。

$$\text{細胞障害活性(\%)} = \frac{\frac{\text{対照群の平均生細胞数(/ml)} - \text{TCF-Ⅱ添加区の平均生細胞数(/ml)}}{\text{対照群の平均生細胞数(/ml)}} \times 100$$

この結果、得られたTCF-ⅡのSarcoma180に対する細胞障害活性を第9図に、またMeth A sarcomaおよびP-388に対するそれを第10図に示した。

いずれの細胞もTCF-Ⅱに高い感受性を示し、TCF-ⅡによるSarcoma180、Meth A sarcomaおよびP-388に対する細胞障害活性IC₅₀はそれぞれ6、40および460ng/mlであった。

実施例4

本例は、実施例1で得られた糖蛋白質TCF-Ⅱのヒト腫瘍細胞株の、卵巣癌細胞株BG-1および乳癌細胞株MCF-7に対する増殖抑制効果を示す。BG-1は10%FCS含むマッコイ培地に、MCF-7は10%FCS、非必須アミノ酸混合液、ビルビン酸およびイーグル塩を含むイーグルMEMに 2×10^4 /mlとなるようにそれぞれの細胞懸濁液を調製した。一方、TCF-Ⅱは、BG-1用には10%FCSを含むマッコイ培地に溶解し4μg/ml濃度のTCF-Ⅱ溶液を調製し、順次、同培地で2倍ずつ釈放し、TCF-Ⅱの段階希釈列を作成した。同様に、MCF-7用には、上記MCF-7用増殖培地でTCF-Ⅱの段階希釈列を作成した。

96ウエルマイクロウエルプレート(ファルコン社製)に50μlずつ各細胞懸濁液を播種した。次いで、BG-1を播種した各ウエルにBG-1用に調製したTCF-Ⅱの各段階希釈溶液をそ

れぞれ50 μ l ずつ加え混合した。MCF-7 についても同様に実施した。CO₂ インキュベーターで37℃、5日間培養した。培養後、培養液を取りのぞき、マイクロウエルプレートで2回洗浄し、各ウエルに付着している細胞をメタノール：水＝1：4の混液に溶解した0.5%クリスタルバイオレット溶液を各ウエルに50 μ l ずつ添加して、染色固定した。蒸留水で各ウエルを洗浄後、プレートを風乾し、色素をセレンソン緩衝液で溶出し、マイクロタイター分光光度計で570nmの吸光度を計測した。

各細胞についてTCF-Ⅱ無添加群を対照として

細胞増殖抑制率(%)＝

$$\left(\frac{\text{コントロールOD570nm} - \text{TCF-Ⅱ添加区OD570nm}}{\text{コントロールOD570nm}} \times 100 \right)$$

を計算し、TCF-Ⅱ濃度との関係を求めた。結果は第11図に示す通りであった。

この結果、BG-1、MCF-7 両腫瘍株ともTCF-Ⅱにより増殖が抑制されることが確認された。

実施例5

本例は、実施例1で得られた糖蛋白質TCF-Ⅱによる前骨髄性白血病株、HL-60の分化誘導活性を示す。

HL-60細胞を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地に $3.5 \times 10^5/ml$ となるように懸濁し、細胞懸濁液を調製した。96穴平底マイクロタイタープレート(ファルコン)の各穴に細胞懸濁液を100 μ l ずつ分注した。ついで同培地で溶解、希釈したTCF-Ⅱ容器100 μ l を最終濃度が15.6、62.5、125、

250、500 および1000ng/ mlとなるように加えた。

37℃、3および7日間培養し、TCF-ⅡによるHL-60 分化誘導活性をニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元能により測定した。また形態変化についても検討した。

1) NBT 還元能

NBT 還元能を第7表に示した。

第 7 表

TCF-Ⅱ 濃 度 (ng/ml)	NBT 還元活性 (%)	
	培養日数 (日)	
	3	7
0	7.4	11.7
15.6	10.6	20.4
62.5	11.1	24.5
125	12.4	28.3
250	16.9	45.2
500	12.4	29.6
1000	12.1	26.8

表中の数値は少なくとも200 個以上の細胞を計数し、その中でNBT を還元し、青黒色フォルマザンを含んでいる細胞の割合を示す。(計2回の実験の平均値を示す)。

(HL-60は正常細胞に分化するとNBT 還元能を獲得し、青黒色フォルマザンを細胞内に蓄積する)

この結果、TCF-Ⅱは前骨髄性白血病株、HL-60 を分化誘導し、250ng/mlで最も高い分化誘導活性を有することが判明した。

2) 形態変化

HL-60 は分化誘導剤の違いによりマイクロファージ系とモノサイト系の2通りの分化を示すことが知られている。37℃ - 7日間培養後のTCF-Ⅱで分化した細胞の形態又は核変化をライトギムザ染色により調べた結果、TCF-ⅡはHL-60をモノサイトに分化誘導することを認めた。

実施例 6

実施例 1 で得られた糖蛋白質TCF-Ⅱによる細胞免疫活性を示す。すなわち、TCF-Ⅱ添加条件下でリンパ球混合培養試験を行ない、リンパ球幼若化反応に対するTCF-Ⅱの活性を検討した。

ヒト抹消血より、Ficall-Conray 法によりリンパ球を分離し、RPMI 1640-10% FCS培地に懸濁した。2個人のリンパ球を、1:1の比で合計 1×10^5 /100 μ l/ウエルとなるように丸底マイクロプレートに添加した後、各種濃度のTCF-Ⅱを添加し、CO₂ インキュベーター下でRPMI-10%FCS 培地にて培養した。培養終了の16時間前に³Hチミジンを0.25 μ Ci/ウエル加えた。培養終了後セルハーベスターにて細胞を回収し、PBS で洗浄後シンチレーションカウンターにより細胞内に取込まれた³Hチミジンの放射能を測定した。

この結果を第12図及び第13図に示す。

第12図に示すように培養5日目には、TCF-Ⅱの作用は認められなかったが、培養8日目において第13図に示すように、最終濃度100ng/mlのTCF-Ⅱ添加群では対照群と比較して有意に³H取込みの上昇が認められ、TCF-Ⅱはサイトトキシッ

クT細胞の増殖、すなわち細胞性免疫を増強する効果を有することが確認された。

実施例 7

実施例 1 で得られた糖蛋白質TCF-Ⅱによる血管内皮細胞増殖活性を示す。

ヒト臍帯由来血管内皮細胞、HUVEC、を供試細胞として用いた。ヒト血管内皮細胞HUVECを2%の牛胎児血清を含むE-GM培地に $2.5 \times 10^4/ml$ となるように懸濁した。

96ウエル平底マイクロウエルプレート（ファルコン社製）の各ウエルに上記細胞懸濁液を50 μ lずつ分注した。

TCF-Ⅱを2%牛胎児血清を含むE-GM培地に溶解し、その50 μ lずつを細胞懸濁液の入った各ウエルに添加し、TCF-Ⅱの最終濃度が0、4、8、16、31、62、125、250、500および1000ng/mlとなるように調製した。37℃、CO₂インキュベーター内で6日間培養した。各ウエルの細胞数は、各ウエルの培地を除き、PBSで洗浄後、トリプシン処理により細胞をはがし、生細胞数を血球計算板にて計数した。

この結果、得られたTCF-Ⅱの正常ヒト血管内皮細胞HUVECに対する作用を第14図に示した。TCF-Ⅱは正常細胞である血管内皮細胞には細胞障害活性を示さず、逆に増殖促進活性を有していることが確認された。特に、TCF-Ⅱ濃度が125 μ g/mlの時に増殖促進活性が最大となった。

以下の実施例は、本発明に係る製剤の処方を示したものである。

実施例 8

TCF- II	20 μ g
ヒト血清アルブミン	100 mg

上記組成を pH7.0 の 0.01M リン酸緩衝液 (PBS) で溶解、全量を 20 ml に調製し滅菌後、バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、凍結乾燥し密封した。

実施例 9

TCF- II	40 μ g
ツイーン 80	1 mg
ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解、全量を 20 ml に調製し濾過滅菌後、バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、凍結乾燥し密封した。

実施例 10

TCF- II	20 μ g
ツイーン 80	2 mg
ソルビトール	4 g

上記組成を PBS に溶解、全量を 20 ml に調製し滅菌後、バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、凍結乾燥し密封した。

実施例 11

TCF- II	40 μ g
ツイーン 80	2 mg
グリシン	2 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解、全量を 20 ml に調製し濾過滅菌後、バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、凍結乾燥し密

封した。

実施例 1 2

TCF- II	40 μ g
ツイーン80	1 mg
ソルビトール	2 g
グリシン	1 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解、全量を 20 ml に調製し濾過滅菌後、バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、凍結乾燥し密封した。

実施例 1 3

TCF- II	20 μ g
ソルビトール	4 g
ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成をPBS に溶解、全量を 20 ml に調製し濾過滅菌後、バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、凍結乾燥し密封した。

実施例 1 4

TCF- II	40 μ g
グリシン	2 g
ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解、全量を 20 ml に調製し濾過滅菌後、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥し密封した。

産業上の利用可能性

本発明は、新規な糖蛋白質を提供するものであって、本発明の糖蛋白質は、腫瘍細胞障害因子、白血病株化誘導因子、細胞免疫能活性因子、血管内皮細胞増殖因子等となり、通常

提供することができる。また、本発明の糖蛋白質は生化学的
あるいは薬理学用の試薬としても用いられる。

請 求 の 範 囲

- (1) ヒト由来の線維芽細胞の培養上清から得られ次のa.~h.の性質を有する糖蛋白質;
- a.分子量;SDS電気泳動法による分子量測定で、非還元では $78,000 \pm 2,000$ 又は $74,000 \pm 2,000$ の分子量であり、還元した場合、 $52,000 \pm 2,000$ の共通バンドAと、 $30,000 \pm 2,000$ のバンドB及び $26,000 \pm 2,000$ のバンドCの2本のバンドを示す。
- b.等電点;7.4 ~8.6
- c.熱安定性;60℃10分間の加熱によっても安定
- d.pH安定性;pH6~9の範囲安定
- e.糖鎖;コンカナバリンA(ConA)セファロースに吸着性を示す
- f.生理活性;KB細胞、HeLa細胞、L-929細胞の増殖を抑制し、IMR-90細胞の増殖を抑制しない
- g.抗体との反応性;抗TNF抗体、抗リンホトキシン抗体、抗インターフェロン β 抗体によって障害活性が中和されない。
- h.N末端アミノ酸配列;上記B及びCがバンドAのサブチェーンとなっており、又バンドAはN末端アミノ酸がブロックされている。サブチェーンB及びCは共に以下のN末端アミノ酸配列をもつ;
- Val-Val-Asn-Gly-Ile-Pro-Thr-
- または
- Val-Val-Asn-Gly-Ile-Pro-Thr-X-Thr-Asn-Ile-Gly-X-Met-Val-Ser-Leu-

ただしXは未同定を意味する。

- (2) 請求の範囲(1)に記載された糖蛋白質を活性成分として含有し、さらにタンパク質類および非イオン界面活性剤類から成る群から選択される1種もしくは2種以上を吸着防止剤として、またはタンパク質類、糖類およびアミノ酸から成る群から選択される1種もしくは2種以上を安定化剤として含有して成る下記の生理活性を示すヒト線維芽細胞由来の生理活性因子製剤；

① 抗腫瘍活性

ヒト由来腫瘍細胞であるKB、HeLa、MCF-7及びBG-1の増殖を抑制し、マウス由来L-929細胞及び腫瘍細胞であるSarcoma 180、Meth A Sarcoma、P388に細胞障害活性を有するが、ヒト正常細胞であるIMR-90の増殖を抑制しない

② 白血病細胞分化誘導活性

ヒト白血病細胞HL-60を顆粒球に分化誘導する

③ 細胞性免疫増強活性

ヒト細胞障害性T細胞の増強

④ ヒト血管内皮細胞の増殖促進活性

ヒト臍帯由来血管内皮細胞の増殖を促進する

⑤ 肝実質細胞の増殖活性

ラット肝臓由来肝実質細胞の増殖を促進する

- (3) 製剤の吸着防止剤として選択するタンパク質がアルブミン又はゼラチンのいずれかである請求の範囲(2)に記載の生理活性因子製剤。

- (4) 製剤の吸着防止剤として選択する非イオン界面活性剤が

ツイーン 80 又はツイーン 20 のいずれかである請求の範囲(2)に記載の生理活性因子製剤。

- (5) 製剤の安定化剤として選択するタンパク質がアルブミン又はゼラチンのいずれかである請求の範囲(2)に記載の生理活性因子製剤。
- (6) 製剤の安定化剤として選択する糖類がソルビトール、マンニトール、キシリールのいずれかである請求の範囲(2)に記載の生理活性因子製剤。
- (7) 製剤の安定化剤として選択するアミノ酸がグリシン又はアラニンのいずれかである請求の範囲(2)に記載の生理活性因子製剤。
- (8) 吸着防止剤としてタンパク質類および非イオン界面活性剤類から選択される 1 つ又は 2 つ以上と安定化剤としてタンパク質類、糖類およびアミノ酸類から選択される 1 つ又は 2 つ以上との種々の組合せを含有する請求の(2)に記載の生理活性因子製剤。
- (9) TCF-Ⅱ をコードする塩基配列を含む DNA。
- (10) 第 15 図に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA。
- (11) 第 15 図に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む cDNA。
- (12) 第 15 図に示す塩基配列を含む cDNA 配列。

FIG. 1

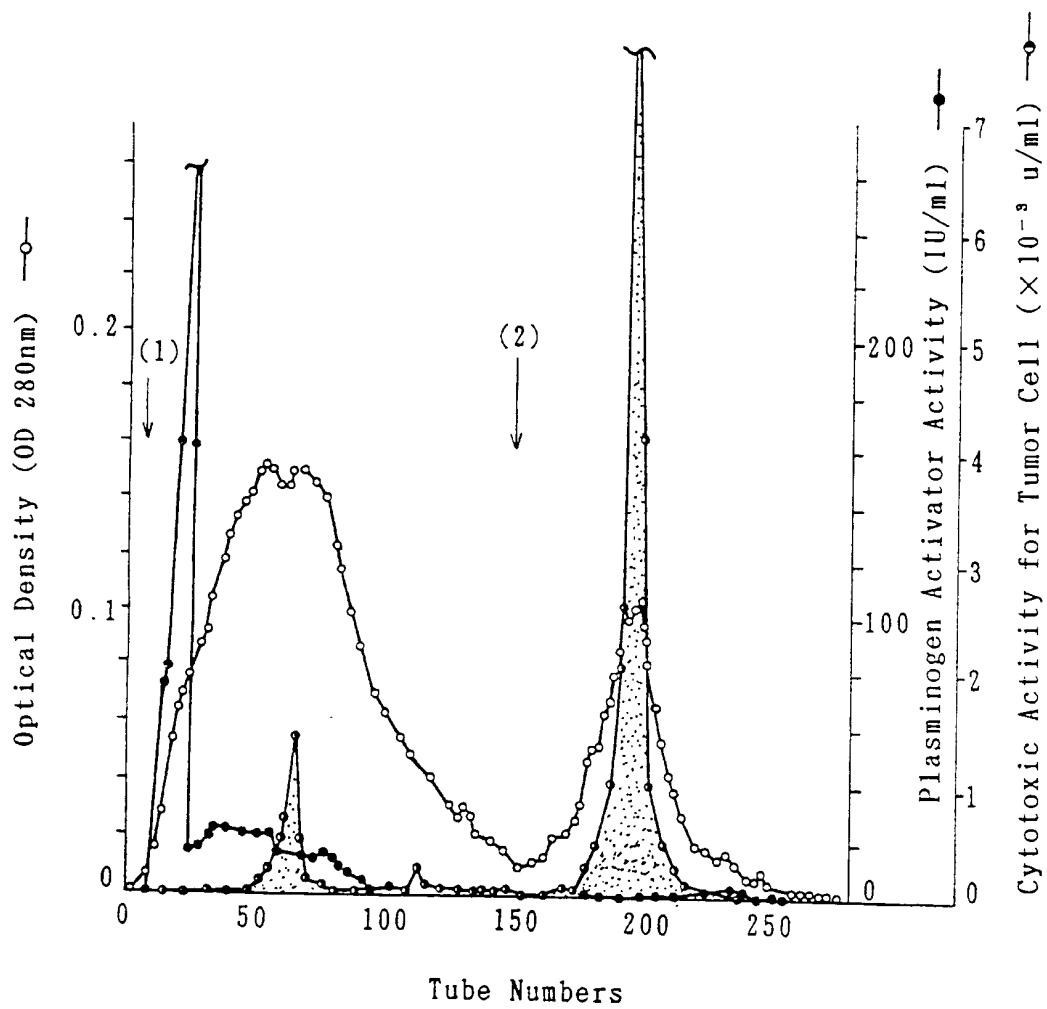
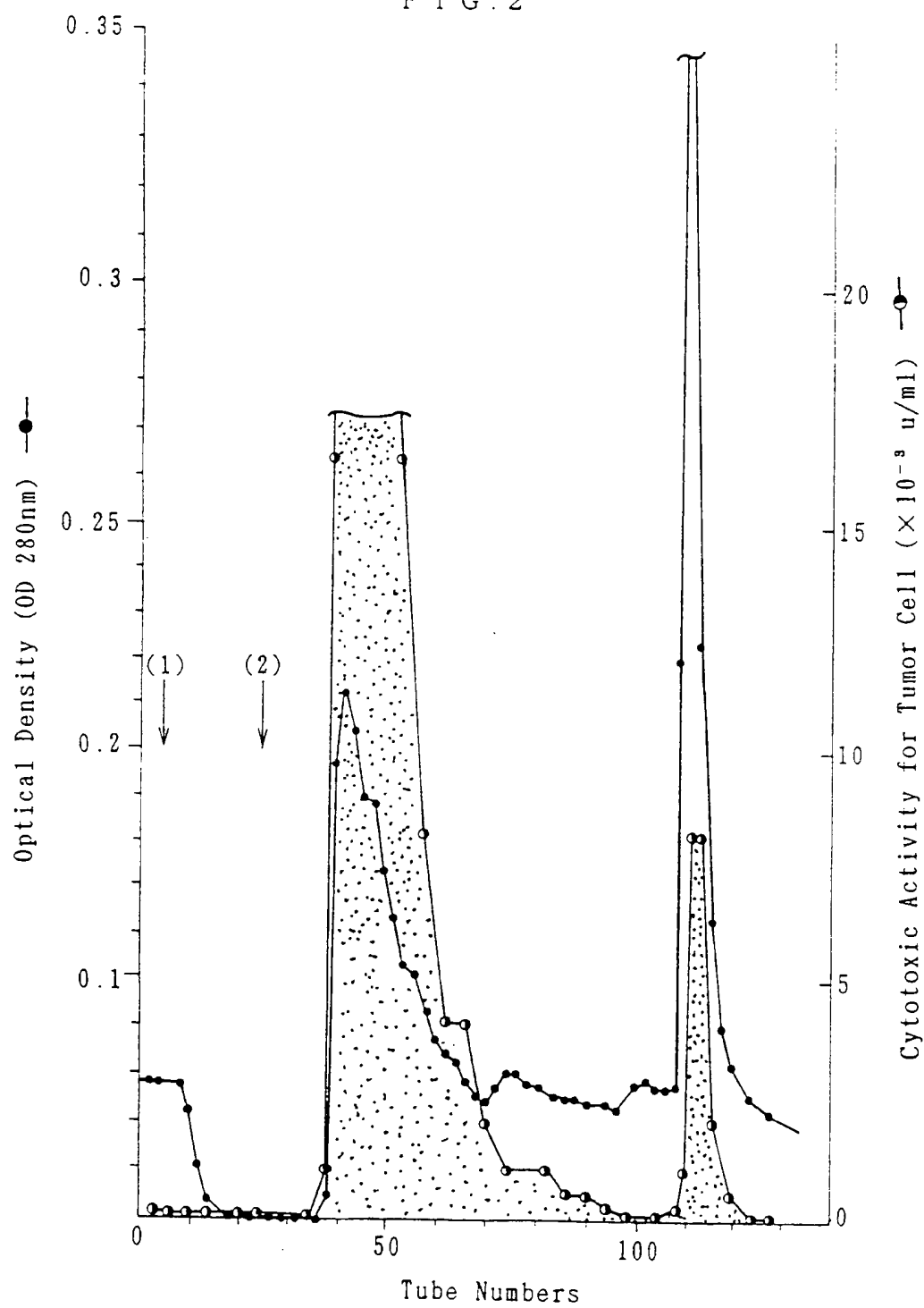


FIG. 2

12/18



3 / 16

FIG. 3

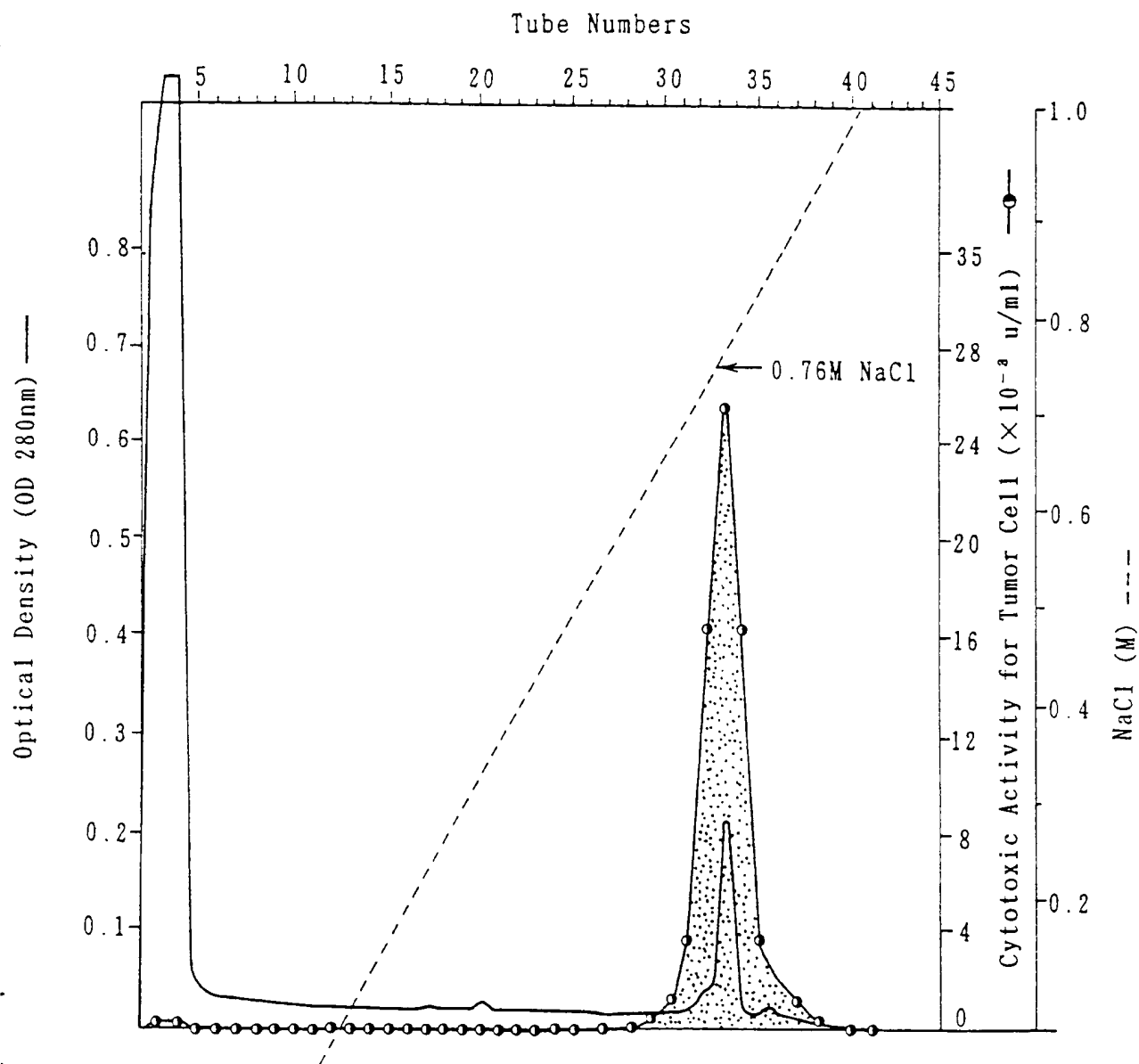


FIG. 4

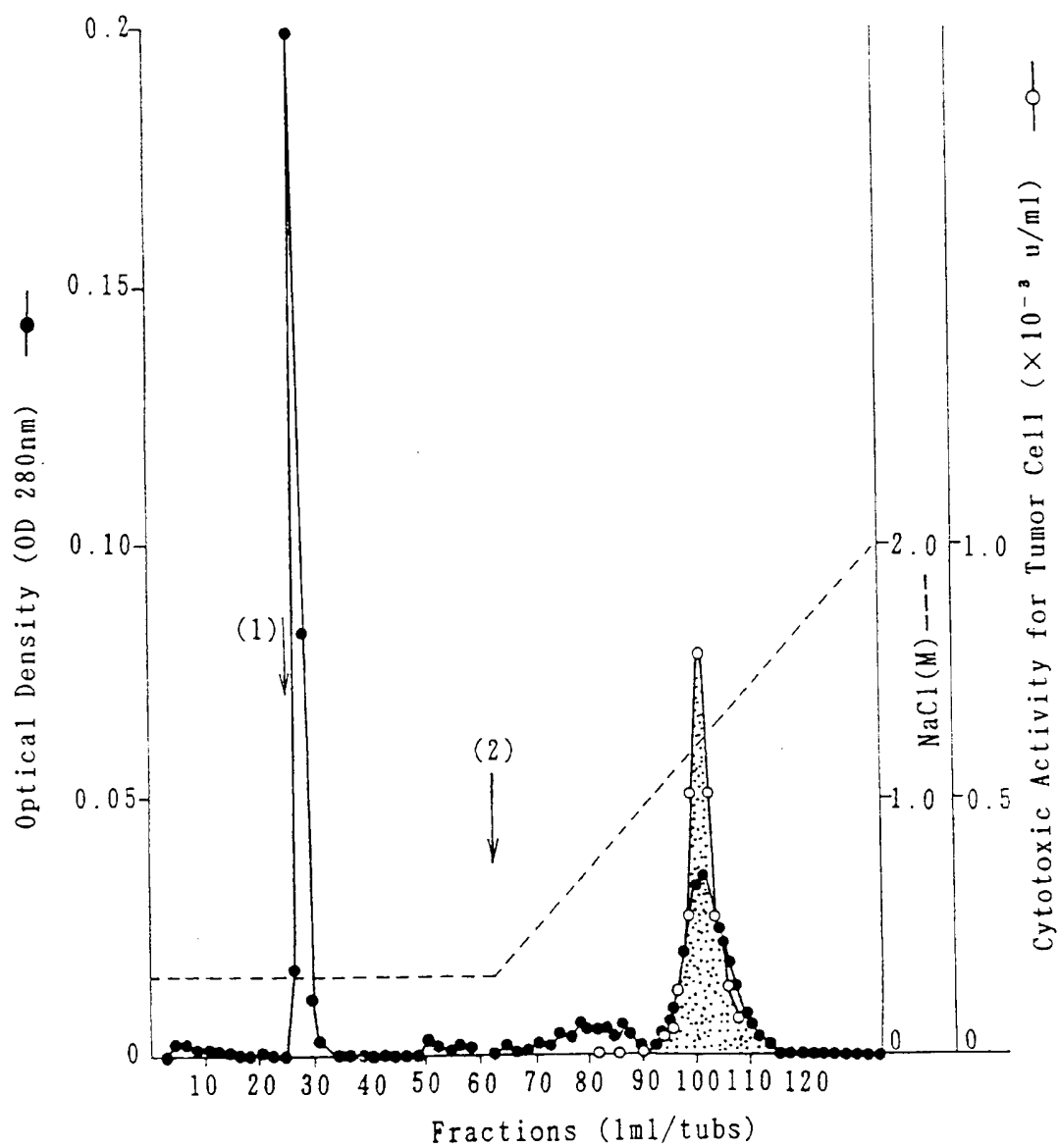
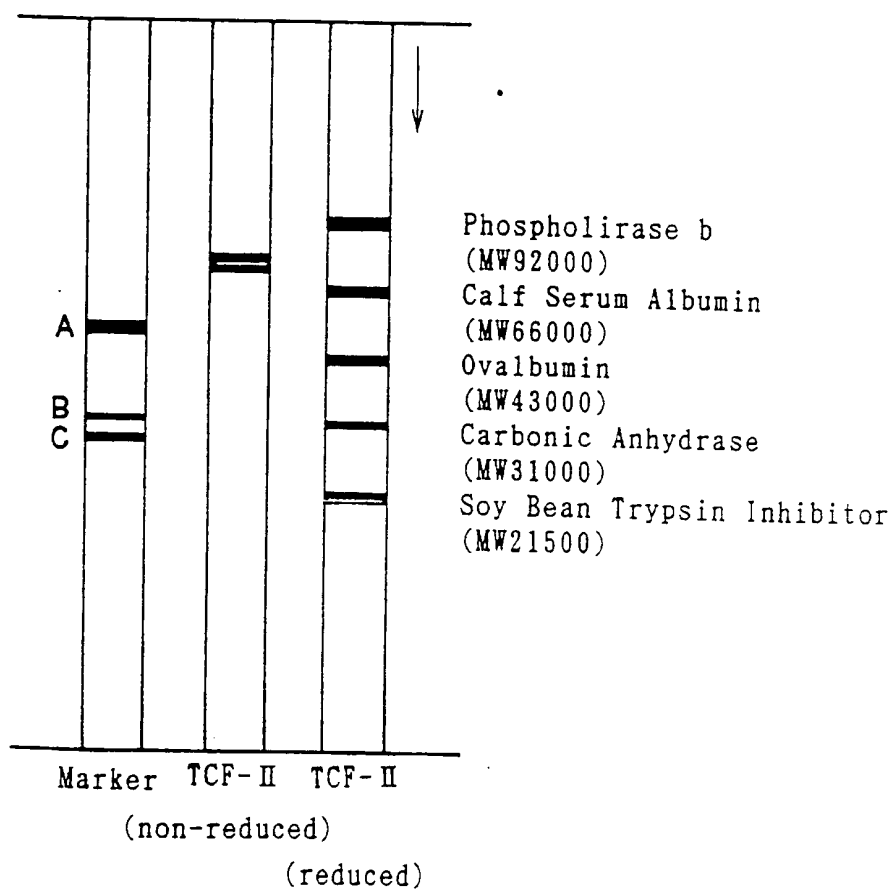


FIG. 5



0718

FIG. 6

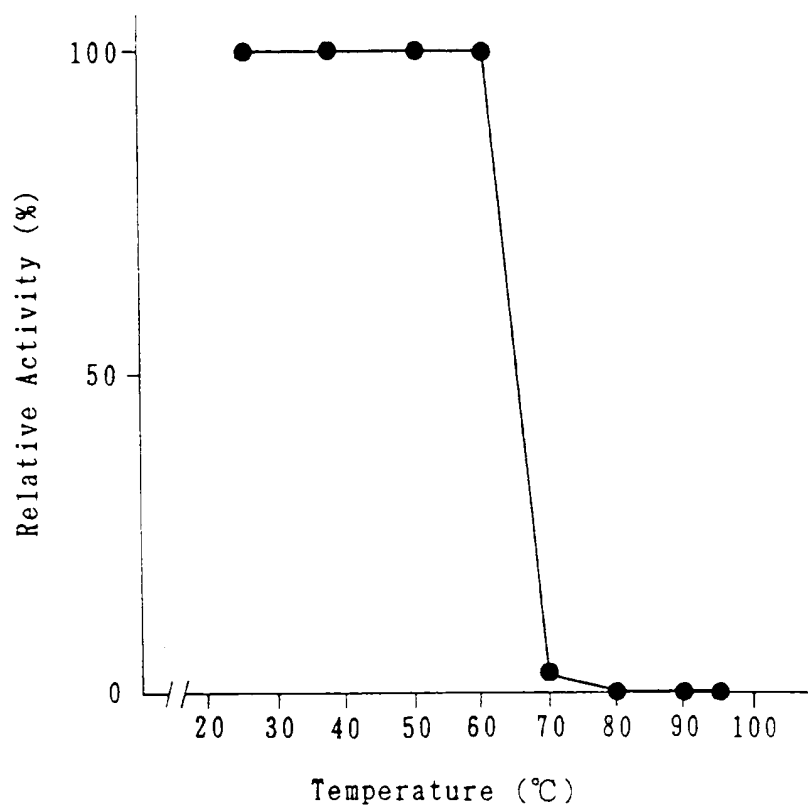
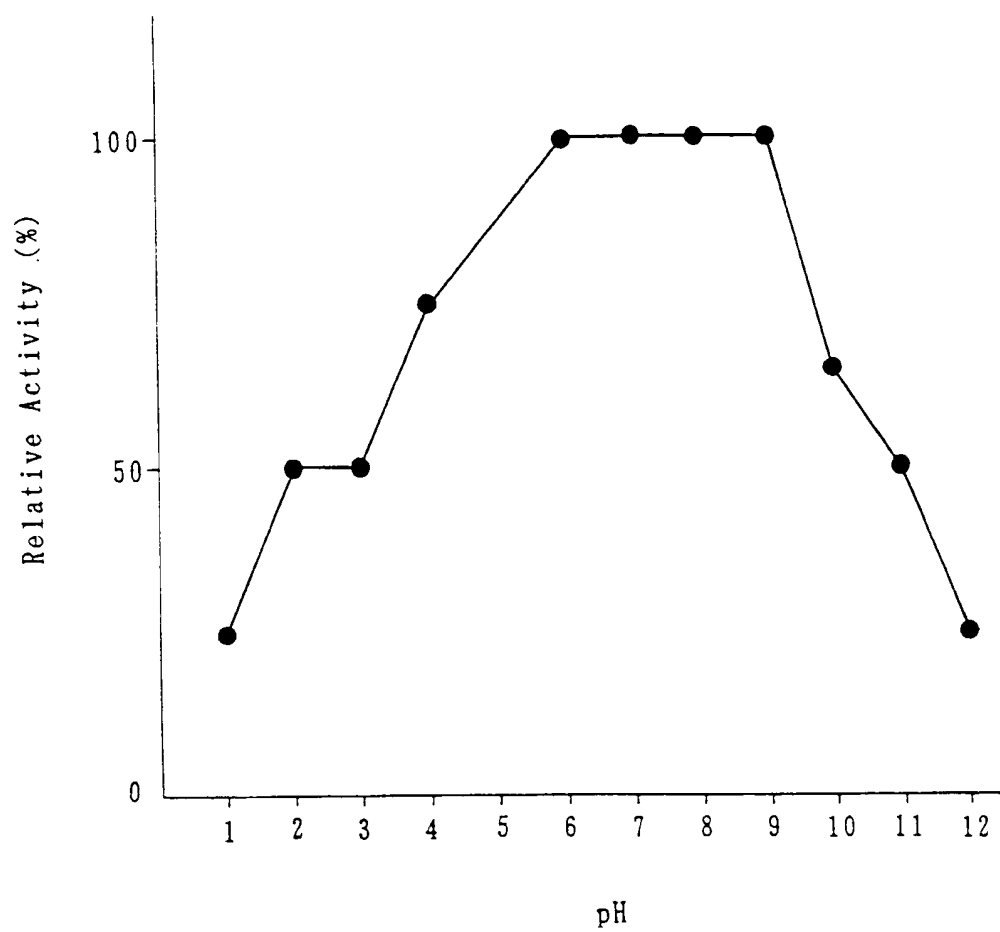
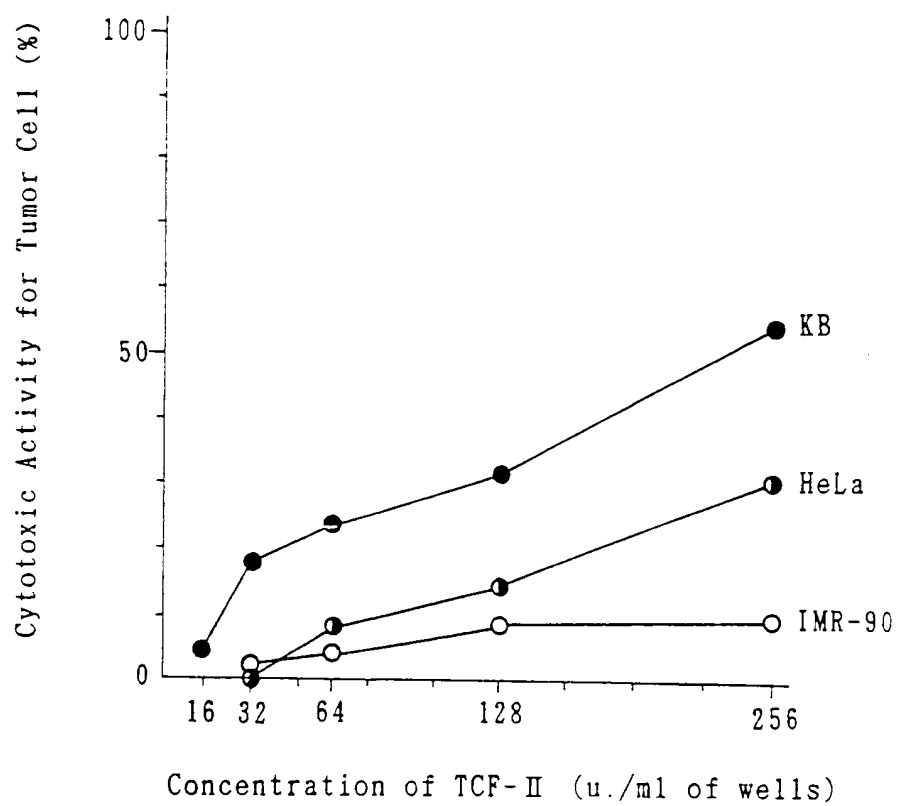


FIG. 7



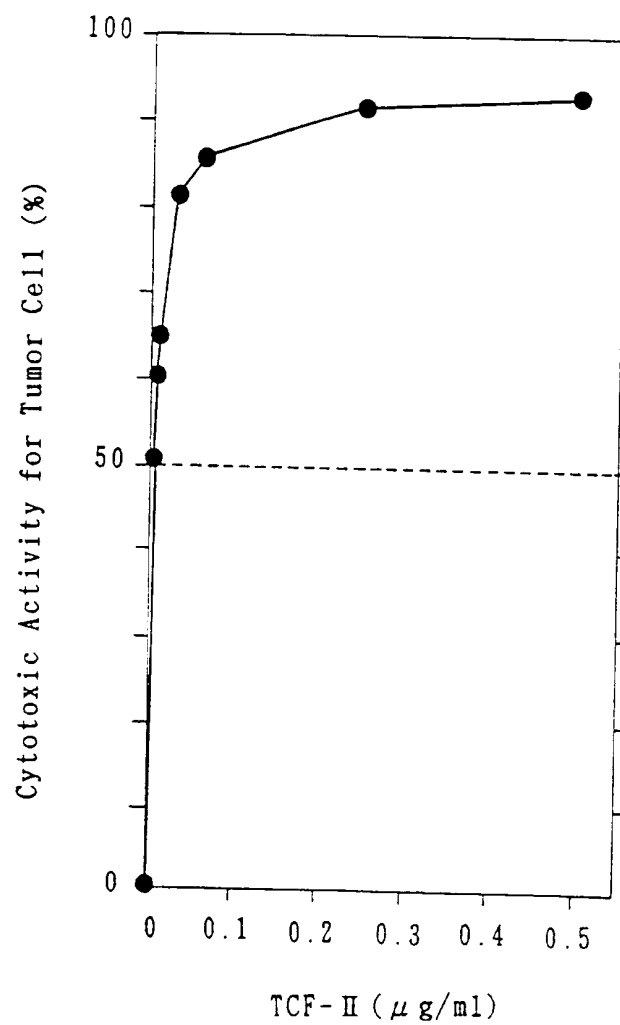
C/13

FIG. 8



9 / 18

FIG. 9



10 / 10

FIG. 10

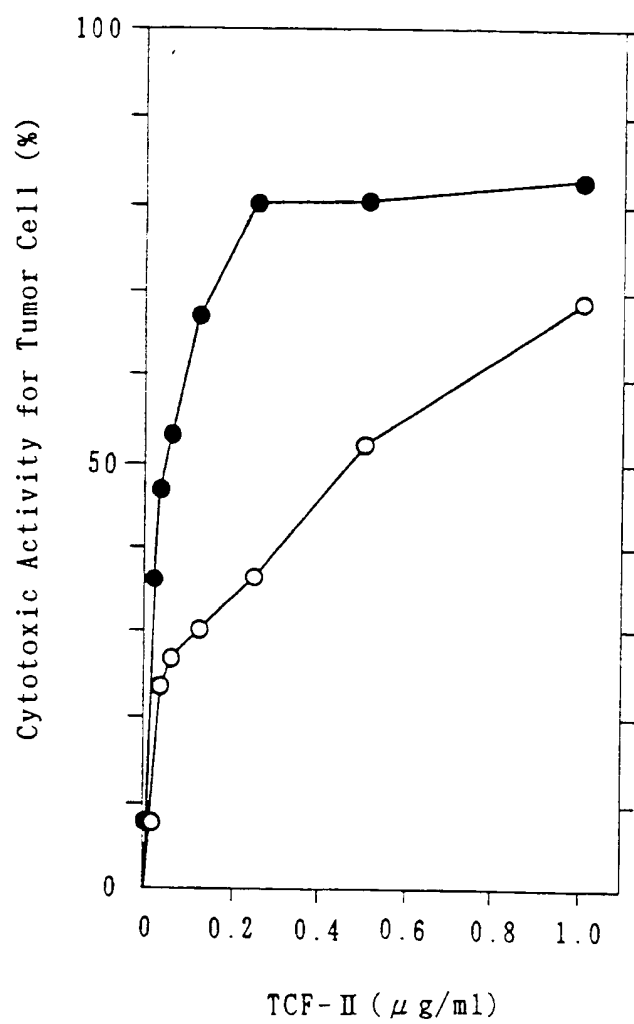
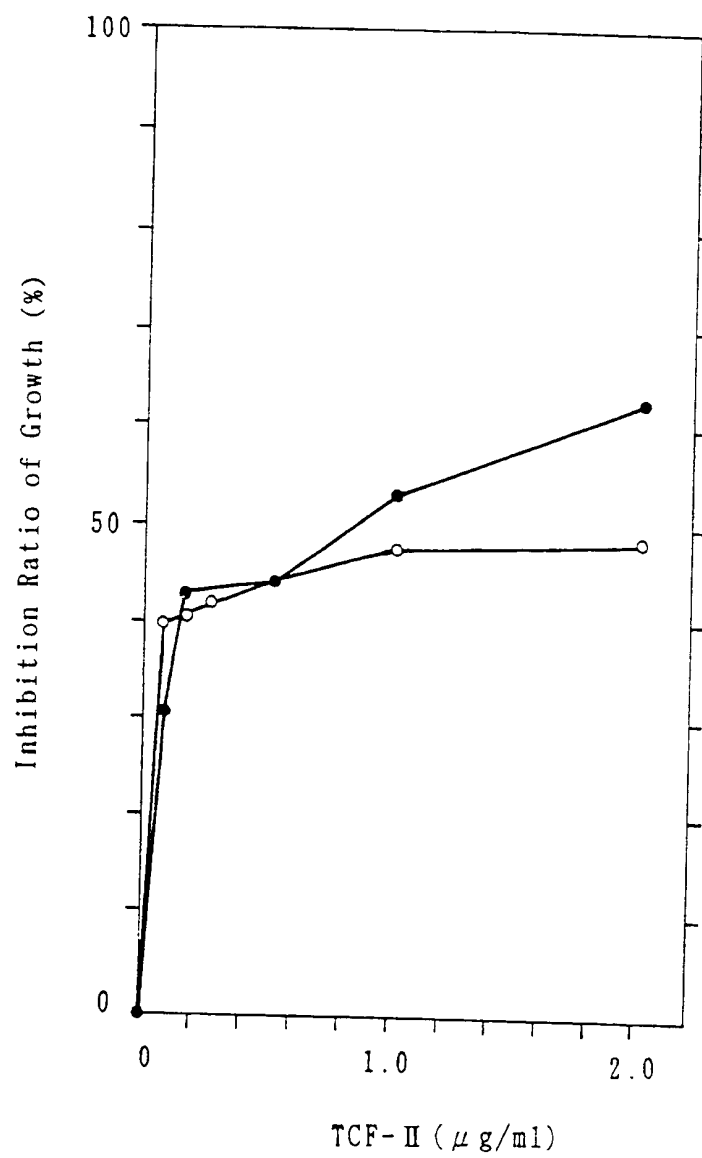
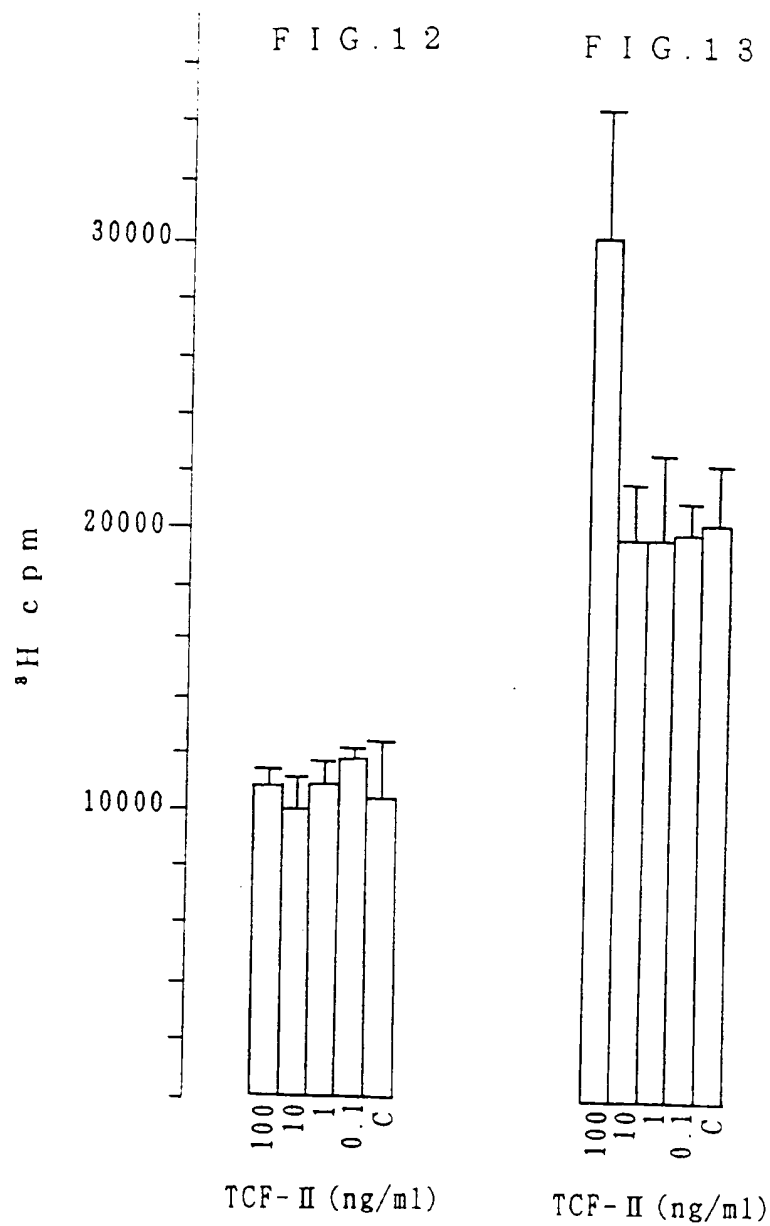


FIG. 11





10 / 10

FIG. 14

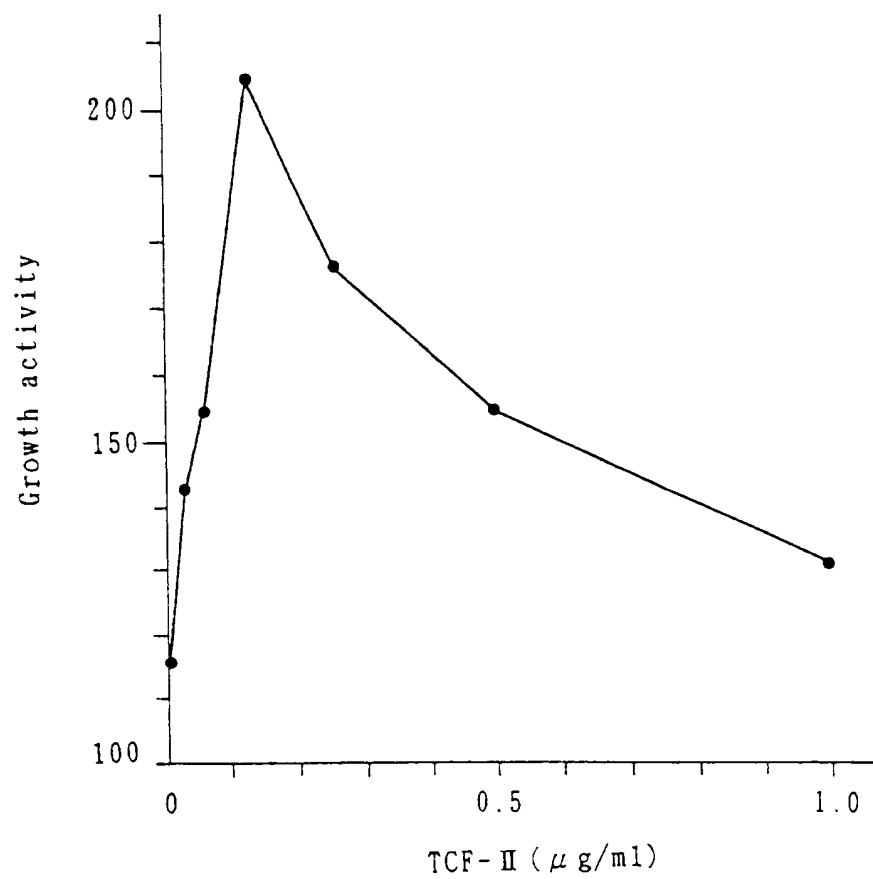


Fig.15 (1)

-110 -100 -90 -80 -70 -60
TAGGCACTGACTCCGAA

-50 -40 -30 -20 -10 0
CAGGATTCTTTACCCAGGCATCTCCTCCAGAGGGATCCGCCAGCCCGTCCAGCAGCACC

10 20 30 40 50 60
ATGTGGGTGACCAAACTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGCTCCTCCTGCATCTCCTC
M W V T K L L P A L L L Q H V L L H L L

70 80 90 100 110 120
CTGCTCCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCAT
L L P I A I P Y A E G Q R K R R N T I H

130 140 150 160 170 180
GAATTCAAAAATCAGCAAGACTACCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAA
E F K K S A K T T L I K I D P A L K I K

190 200 210 220 230 240
ACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTT
T K K V N T A D Q C A N R C T R N K G L

250 260 270 280 290 300
CCATTCAGTTGCAAGGCTTTTGTGTTTATGATAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCCC
P F T C K A F V F D K A R K Q C L W F P

310 320 330 340 350 360
TTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAA
F N S M S S G V K K E F G H E F D L Y E

370 380 390 400 410 420
AACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCGCTACAAGGGAACAGTA
N K D Y I R N C I I G K G R S Y K G T V

430 440 450 460 470 480
TCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCATGATACCACACGAACAC
S I T K S G I K C Q P W S S M I P H E H

490 500 510 520 530 540
AGCTATCGGGTAAAGACCTACAGGAAACTACTGTGCAAAATCCTCGAGGGGAAGAAGGG
S Y R G K D L Q E N Y C R N P R G E E G

550 560 570 580 590 600
GGACCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATTCCTCAG
G P W C F T S N P E V R Y E V C D I P Q

610 620 630 640 650 660
TGTTTCAGAAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGTCTCATGGATCAT
C S E V E C M T C N G E S Y R G L M D H

670 680 690 700 710 720
ACAGAATCAGGCAAGATTTGTGAGCGCTGGGATCATCAGACACCACACCGGCACAAATTC
T E S G K I C Q R W D H Q T P H R H K F

730 740 750 760 770 780
TTGCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTATTGCCGCAATCCCGATGGC
L P E R Y P D K G F D D N Y C R N P D G

790 800 810 820 830 840
CAGCGGAGGCCATGGTGTACTCTTGACCCTCACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATT
Q P R P W C Y T L D P H T R W E Y C A I

850 860 870 880 890 900
AAAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCTTTGGAAACAACCTGAATGC
K T C A D N T M N D T D V P L E T T E C

910 920 930 940 950 960
ATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATACCATTTGGAATGGAATTCCT
I Q G Q G E G Y R G T V N T I W N G I P

970 980 990 1000 1010 1020
TGTCAGCGTTGGGATTCTCAGTATCCTCAGGAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAG
C Q R W D S Q Y P H E H D M T P E N F K

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TGCAAGGACCTACGAGAAAATTACTGCCGAAATCCAGATGGGTCTGAATCACCCTGGTGT
C K D L R E N Y C R N P D G S E S P W C

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TTTACCACTGATCCAAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCCAAAATCCAAACTGTGATATG
F T T D P N I R V G Y C S Q I P N C D M

Fig.15 (2)

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAATTATATGGGCAACTTATCCCAA
 S H G Q D C Y R G N G K N Y M G N L S Q α 鎖内部アミノ酸配列

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 ACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACATGGAAGACTTACATCGTCAT
 T R S G L T C S M W D K N M E D L H R H

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 ATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTACTGCCGAAATCCAGATGAT
 I F W E P D A S K L N E N Y C R N P D D

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 GATGCTCATGGACCCTGGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCCCTGGGATTATTGCCCT
 D A H G P W C Y T G N P L I P W D Y C P

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACACACCTACAATAGTCAATTAGACCATCCCGTAATA
 I S R C E G D T T P T I Y N L D H P V I

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCTTGTCCCAAAACGAAACAATTGCGAGTTTGTAAATGGGATTCCAACACGAAACAAACATA
 S C A K T K Q L R V V N G I P T R T N I β 鎖N末端 β 鎖N末端アミノ酸配列

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GGATGGATGGTTAGTTTGAGATACAGAAATAAACATATCTGCGGAGGATCATTGATAAAG
 G W M V S L R Y R N K H I C G G S L I K

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GAGAGTTGGGTTCTTACTGCACGACAGTGTTCCTTCTCGAGACTTGAAAGATTATGAA
 E S W V L T A R Q C F P S R D L K D Y E

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GCTTGGCTTGGAAATTCATGATGTCCACGGAAGAGGAGATGAGAAATGCAACAGGTTCTC
 A W L G I H D V H G R G D E K C K Q V L

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 AATGTTTCCCAGCTGGTATATGCCCTGAAGGATCAGATCTGGTTTAAATGAAGCTTGCC
 N V S Q L V Y G P E G S D L V L M K L A

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 AGGCCCTGCTGCTGGATGATTTTGTAGTACGATTGATTACCTAATTATGGATGCACA
 R P A V L D D F V S T I D L P N Y G C T

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 ATTCTGAAAGACCCAGTGGCAGTGTTTATGGCTGGGGCTACACTGGATTGATCAACTAT
 I P E K T S C S V Y G W G Y T G L I N Y β 鎖内部アミノ酸配列

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 GATGGCTATTACGAGTGGCACATCTCTATATAATGGGAAATGAGAAATGCAGCCAGCAT
 D G L L R V A H L Y I M G N E K C S Q H

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 CATCGAGGGAAGGTGACTCTGAATGAGTCTGAAATATGTGCTGGGGCTGAAAAGATTGGA
 H R G K V T L N E S E I C A G A E K I G

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 TCAGGACCATGTGAGGGGGATTATGGTGGCCCACTTGTGTTGTGAGCAACATAAAATGAGA
 S G P C E G D Y G G P L V C E Q H K M R

2050 2060 2070 2080 2090 2100
 ATGGTTCTTGGTGTCAATTGTCCTGGTGGTGGATGTGCCATTCCAAATCGTCCTGGTATT
 M V L G V I V P G R G C A I P N R P G I

2110 2120 2130 2140 2150 2160
 TTTGTCCGAGTAGCATATTATGCAAAATGGATACACAAAATTATTTAATCATATAAGGTA
 F V R V A Y Y A K W I H K I I L T Y K V

2170 2180 2190 2200 2210
 CCACAGTCATAGCTGAAGTAAGTGTGTCTGAAGCACCACCAATACAATCTGT
 P, Q S *

1
MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRNTIHEFKSAKTTLIKIDPALKIK

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRNTIHEFKSAKTTLIKIDPALKIK
1

61
TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYE

TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYE
61

121
NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEH-----SYRGKDLQENYCRNP

NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNP
121

176
RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTP

RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTP
181

236
HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPL

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPL
241

296
ETTECIQQGEGYRGTVNTIWNIGIPQQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGS

ETTECIQQGEGYRGTVNTIWNIGIPQQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGS
301

356
ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNME

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNME
361

416
DLHRHIFWEPDASKLNYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNL

DLHRHIFWEPDASKLNYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNL
421

476
DHPVISCATKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFFSRD

DHPVISCATKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFFSRD
481

536
LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTIDL

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTIDL
541

596
NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAG

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAG
601

656
AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKKMRMVLGVI VPGRGCAIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKII

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKKMRMVLGVI VPGRGCAIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKII
661

716 723
LTYKVPQS

LTYKVPQS
721 728

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/00314

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C07K15/14, A61K37/02, C12N15/19//C12P21/02 (C12P21/02, C12R1:91)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K15/14, A61K37/02, C12N15/19, C12P21/00, 21/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the fields searched ⁸		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 58-148826 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 5 September 1983 (05. 09. 83) & DE, A1, 3306297 & FR, A1, 2522267 & US, A, 4481137	1 - 12
A	JP, A, 1-10998 (The Green Cross Corp.), 13 January 1989 (13. 01. 89) & EP, A2, 322084	1 - 12
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
May 31, 1990 (31. 05. 90)	June 18, 1990 (18. 06. 90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP90 / 00314

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K15/14, A61K37/02, C12N15/19, C12P21/02 (C12P21/02, C12R1:91)		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K15/14, A61K37/02, C12N15/19, C12P21/00, 21/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOISIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, A, 58-148826 (持田製薬株式会社), 5. 9月. 1983 (05. 09. 83) & DE, A1, 3306297 & FB, A1, 2522267 & US, A, 4481137	1-12
A	JP, A, 1-10998 (株式会社 ミドリ十字), 13. 1月. 1989 (13. 01. 89) & EP, A2, 322084	1-12
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
31. 05. 90	18.06.90	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生